

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KARADENİZ BÖLGESİNDE KOYUN VE
KEÇİLERDE *THEILERIA* VE *BABESIA*
TÜRLERİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Mehmet Fatih AYDIN

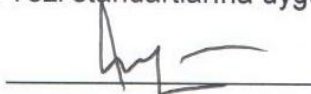
2011

ONAY SAYFASI


Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU

Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi
olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nazir DUMANLI

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

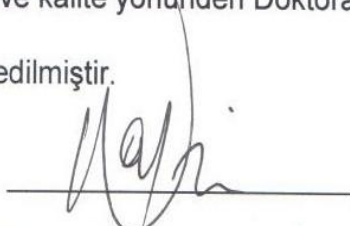
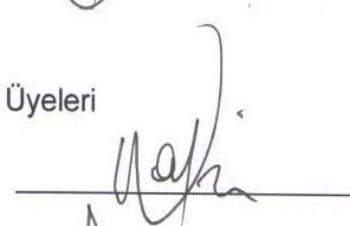
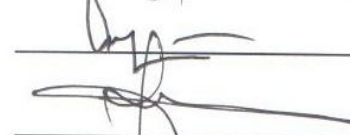
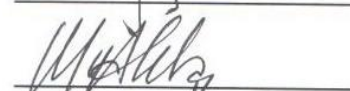
Prof. Dr. Nazir DUMANLI

Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU

Prof. Dr. Ferda SEVİNÇ

Prof. Dr. Münir AKTAŞ

Doç. Dr. Cem E. ŞAKİ


TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren, bilgi beceri ve tecrübelerinden daima faydalandığım ve mesai kavramı olmadan çalışmalarına destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nazir DUMANLI'ya şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar ve tez çalışmalarımda yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen, moleküler parazitolojik tekniklerin uygulanışı da dahil, kendisinden çok şey öğrendiğim Sayın Prof. Dr. Münir AKTAŞ'a, laboratuvar çalışmalarımda daima yanımda olan Sayın Doç. Dr. Kürşat ALTAY'a, saha çalışmalarımdeki yardımları için Veteriner Hekimler Yasin BAYKALIR, Çağrı ÖZÇETİN ve Sezayi ÖZÜBEK ile Bolu, Kastamonu, Çorum, Samsun, Tokat, Giresun ve Bayburt illerindeki Veteriner Hekim meslektaşlarıma, teknisyenlere ve hayvan yetiştiricilerine teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca sıcak ilgilerini esirgemeyen Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU, Doç. Dr. Sami ŞİMŞEK ve Doç. Dr. Cem Ecmel ŞAKİ'ye, doktora yapmam konusundaki teşviklerinden dolayı Prof. Dr. Behiç COŞKUN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her anında maddi ve manevi yönden benimle beraber olan çok kıymetli aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından TOVAG 109 O 766 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Doktora eğitimim boyunca burs desteğini de aldığım TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

I. Başlık Sayfası	i
II. Onay Sayfası	ii
III. Teşekkür	iii
IV. İçindekiler	iv
V. Tablo Listesi	vi
VI. Şekil Listesi	viii
VII. Kısaltmalar Listesi	ix
1. Özet	1
2. Abstract	3
3. Giriş	5
4. Gereç ve Yöntem	26
4.1. Çalışma alanının ve örnek sayısının belirlenmesi	26
4.2. Saha Çalışmaları	28
4.2.1. Kan örneklerinin toplanması	28
4.2.2. Kenelerin toplanması	31
4.3. Laboratuvar çalışmaları	32
4.3.1. Mikroskopik muayene	32
4.3.2. Kene identifikasyonu	33
4.3.3. Moleküler çalışmalar	33
4.3.3.1. DNA ekstraksiyonu	33
4.3.3.2. Kontrol DNA örnekleri	34
4.3.3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	34

4.3.3.4. Agaroz jel elektroforezi	36
4.3.3.5. Revers line blotting (RLB)	36
4.3.3.5.1. RLB membranının hazırlanması	39
4.3.3.5.2. Revers line blotting	40
4.4. Çalışmada kullanılan solüsyonlar	41
4.4.1. Mikroskopide kullanılan solüsyonlar	41
4.4.2. DNA ekstraksiyonu için gerekli solüsyonlar	41
4.4.3. PZR için gerekli solüsyonlar	42
4.4.4. Agaroz jel elektroforezi için gerekli solüsyonlar	43
4.4.5. Revers line blotting için gerekli solüsyonlar	44
4.5. İstatistiksel analiz	47
5. Bulgular	48
5.1. Mikroskopik muayene sonuçları	48
5.2. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları	48
5.3. Revers line blotting sonuçları	49
5.4. Kene identifikasyon sonuçları	55
6. Tartışma	61
7. Kaynaklar	73
8. Özgeçmiş	82

TABLO LİSTESİ

	No
Tablo 1: Karadeniz bölgesinde araştırma kapsamındaki iller ve 2009 yılı verilerine göre koyun ve keçi sayıları.....	27
Tablo 2: Çalışmanın yürütüldüğü illere göre kan örnekleri toplanan koyun ve keçi sayıları.....	31
Tablo 3: Çalışmanın yürütüldüğü illere göre kene yönünden muayene edilen koyun ve keçi sayıları ve toplanan kene sayıları.....	32
Tablo 4: Çalışmada kullanılan primer dizilimleri.....	35
Tablo 5: Çalışmada kullanılan Touch Down PZR ısı şartları.....	35
Tablo 6: Touch Down PZR reaksiyonu içeriği	35
Tablo 7: Çalışmada kullanılan prob dizilimleri.....	38
Tablo 8: Karadeniz bölgesinde mikroskopi, PZR ve RLB ile saptanan <i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> türlerinin illerde koyun ve keçilere göre dağılımı.....	52
Tablo 9: RLB ile koyun ve keçilerde belirlenen <i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> türlerinin prevalansı.....	53
Tablo 10: Mikroskobik bakı, PZR ve RLB sonuçların odaklara dağılımı.....	53
Tablo 11: Mikroskopi, PZR ve RLB sonuçlarının Pearson Chi-Square testi ile karşılaştırılması.....	54

Tablo 12: RLB ile belirlenen pozitiflik oranlarının illere göre Pearson Chi-Square testi ile karşılaştırılması.....	54
Tablo 13: Karadeniz bölgesinde tespit edilen <i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> türlerinin görülme sıklığının Pearson Chi-Square testi ile karşılaştırılması.....	54
Tablo 14: Karadeniz bölgesinde <i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> enfeksiyonlarının koyun ve keçilerde görülme sıklığının Pearson Chi-Square testi ile karşılaştırılması.....	54
Tablo 15: Çalışmanın yürütüldüğü illere göre muayene edilen ve kene tespit edilen koyun ve keçi sayıları ile toplanan kene sayıları ve enfestasyon oranları.....	56
Tablo 16: Tespit edilen kene türlerinin illere göre dağılımı.....	57
Tablo 17: Tespit edilen kene türlerinin koyun ve keçilerdeki dağılımı.....	58
Tablo 18: Tespit edilen kene türlerinin mevsimlere göre dağılımı.....	60

ŞEKİL LİSTESİ

	No
Şekil 1: Karadeniz bölgesinde örneklerin toplandığı iller.....	27
Şekil 2: Karadeniz bölgesinde koyun ve keçilerden kan ve kene örneklerinin alındığı merkezler.....	29
Şekil 3: RLB'nin çalışma prensibi.....	37
Şekil 4: <i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> soy spesifik RLB-R2-Biotin, RLB-F2 primerleri ile yapılan PZR'de elde edilen ürünlerin etidium bromide ile boyalı agarose jeldeki görünümü.....	49
Şekil 5: <i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> tür / genotipleri ile enfekte koyun ve keçilere ait genomik DNA'ların ve negatif kontrollerin template olarak kullanılarak amplifikasyonu sonucu yapılan Revers Line Blotting görüntüsü.....	51

KISALTMALAR LİSTESİ

µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
bç	: Baz çifti
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
dNTP	: Deoksinükleot trifosfat
ECL	: Chemiluminescent Detection Agent
EDAC	: 1-ethyl-3 (dimethylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	: Etilendiamintetra-asetik asit
gDNA	: genomik DNA
HCl	: Hidroklorik asit
IFAT	: İndirek Floresan Antikor Testi
ITS	: Internal Transcribed Spacers
KCl	: Potasyum klorür
M	: Molar
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
pH	: Potansiyel hidrojen
pmol	: Pikomol
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RLB	: Revers Line Blotting
RNA	: Ribonükleik asit

RNaz	: Ribonükleaz
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
sp.	: Species (tür)
spp.	: Species (türler)
SSPE	: Standard Sodiumfosfat EDTA
ssu rRNA	: Small Subunit Ribosomal RNA
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA tampon solüsyonu
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviole

1. ÖZET

Bu çalışma Türkiye'nin Karadeniz bölgesinde koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin varlığı ve yayılışının mikroskopik bakı ve revers line blotting (RLB) yöntemleri ile araştırılması ve bölgede koyun ve keçilerde bulunan kene türlerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla 2010 ve 2011 yıllarında bölgedeki çeşitli illere bağlı değişik odaklardaki koyun ve keçilerden 1128 kan örneği toplanmış (869 koyun ve 259 keçi) kan örneği toplanan koyun ve keçiler de dahil 2608 hayvan (2161 koyun ve 447 keçi) kene enfestasyonu yönünden muayene edilmiştir.

Alınan kan örneklerinden sürme frotiler hazırlanmış, tekniğine uygun olarak boyanmış ve mikroskopta *Theileria* ve *Babesia* piroplazmaları yönünden incelenmiştir. EDTA'lı kan örneklerinden uygun yöntemlerle genomik DNA'lar ekstrakte edilmiş, bu DNA'lar kullanılarak *Theileria* ve *Babesia* türlerinin 18S ssu rRNA geninin değişken V4 bölgesindeki, uzunluğu 360-430 bp olan bir bölge çoğaltılmış, elde edilen PZR ürünleri, tür spesifik probların bağlandığı bir membranda hibridize edilmiştir. Toplanan keneler stereo mikroskop altında incelenmiş ve tür identifikasyonları yapılmıştır.

Kan frotilerinin mikroskopik muayenesinde 34 koyun (%3,91) ve 4 (%1,54) keçi olmak üzere toplam 38 (%3,37) hayvan *Theileria* spp.

piroplasm formları yönünden pozitif bulunmuş, hiçbir hayvanda *Babesia* spp. piroplasmaları tespit edilememiştir.

RLB ile bölgede *T. ovis*'in koyunlarda %34,64, keçilerde %10,04 ve toplamda %28,99; *B. ovis*'in koyunlarda %0,58 ve toplamda %0,44; *Theileria* sp. OT3'ün koyunlarda %2,65, ve toplamda %2,04; *Theileria* sp. MK'nın koyunlarda %0,58, keçilerde %0,77 ve toplamda %0,62 oranlarında yayılış gösterdiği, *B. ovis* ve *Theileria* sp. OT3'ün sadece koyunlarda bulunduğu saptanmıştır.

Koyunların 665'i (%30,77) ve keçilerin 147'si (%32,89) olmak üzere 812 hayvanda (%31,13) kene enfestasyonu belirlenmiş, 2263'ü koyunlardan, 534'ü de keçilerden olmak üzere 2797 kene toplanmıştır. Bu keneler *Rhipicephalus turanicus* (%28,64), *Haemaphysalis parva* (%22,60), *R. bursa* (%18,27), *Dermacentor marginatus* (%16,55), *R. sanguineus* (%3,32), *Ixodes ricinus* (%2,47), *H. punctata* (%2,36), *Hyalomma marginatum* (%2,22), *H. sulcata* (%1,39), *H. excavatum* (%1,18), *H. concinna* (%0,54) ve *H. detritum* (%0,46) olarak teşhis edilmiştir. Kenelerin mevsimsel dağılımına bakıldığında ise *Rhipicephalus* ve *Hyalomma*'ların ilkbahar ve yaz; *Haemaphysalis*'lerin kış, ilkbahar ve sonbahar; *Dermacentor* ve *Ixodes*'lerin ise bütün mevsimlerde görüldüğü ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Karadeniz, koyun, keçi, *Babesia*, *Theileria*, mikroskopi, RLB, kene.

2. ABSTRACT

Detection of *Theileria* and *Babesia* species in sheep and goats with molecular methods in the Black Sea Region

This study was carried out to investigate presence and distribution of *Theileria* and *Babesia* species with microscopic examination and reverse line blotting (RLB) techniques in sheep and goats in the Black Sea region of Türkiye and to determine the tick species of these animals in the region. For this purpose 1128 blood samples (869 sheep and 259 goat) were collected from sheep and goats by using the vacutained tubes containing EDTA in different provinces of various cities in the region in 2010 and 2011 years. A total of 2608 animals (2161 sheep and 447 goats) including blood samples collected sheep and goats were examined for tick infestation.

Smears were prepared from the blood samples and stained with Giemsa and examined under the light microscope for *Theileria* and *Babesia* piroplasms. The genomic DNAs were extracted from blood samples. The length of 360-430 bp fragment in the variable V4 region of 18S SSU rRNA gene of *Theileria* and *Babesia* species was amplified using the gDNAs. The PCR products were hybridized to the membrane connected species specific probes. Ticks were examined for identification under the stereo microscope.

A total of 38 animals (3.37%) including 34 sheep (3.91%) and 4 goats (1.54%) were found to be positive for *Theileria* spp. piroplasms in microscopic examination of smears while *Babesia* spp. piroplasm could not detected.

Infection rates were 34.64% in sheep, 10.04% in goats and totally 28.99% for *T. ovis* while 0.58% in sheep and totally 0.44% for *B. ovis*. However, *Theileria* sp. OT3 was detected in 2.65% of sheep and 2.04% of all animals, besides *Theileria* sp. MK had a 0.58% prevalence in sheep, 0.77% in goats and totally 0.62% with RLB. Although *T. ovis* and *Theileria* sp MK were determined in both sheep and goats, *B. ovis* and *Theileria* sp. OT3 were observed only in the sheep.

A total of 812 animals (31.13%) that included 665 sheep (30.77%) and 147 goats (32.89%) were found to be infested with ticks. Totally 2797 ticks (2263 from sheep and 534 from goats) were collected. Ticks were identified as *R. turanicus* (%28,64), *H. parva* (%22,60), *R. bursa* (%18,27), *D. marginatus* (%16,55), *R. sanguineus* (%3,32), *I. ricinus* (%2,47), *H. punctata* (%2,36), *H. marginatum* (%2,22), *H. sulcata* (%1,39), *H. excavatum* (%1,18), *H. concinna* (%0,54) and *H. detritum* (%0,46). Seasonal distribution of identified ticks were detected that *Rhipicephalus* and *Hyalomma* present in spring and summer, *Haemaphysalis* in winter, spring and autumn, *Dermacentor* and *Ixodes* in all seasons.

Key Words: Black Sea, sheep, goat, *Babesia*, *Theileria*, microscopy, RLB, tick.

3. GİRİŞ

Türkiye ekonomisinde önemli bir paya sahip olan hayvancılık, bakım ve beslenmedeki olumsuzlukların yanında, ülkenin subtropikal iklim kuşağında yer alması nedeni ile bakteriyel, viral ve paraziter kökenli hastalıkların da tehdidi altındadır. Paraziter hastalıklar içerisinde kene enfestasyonları hayvanlara direkt ve indirekt etkileri nedeni ile ayrı bir öneme sahiptir.

Keneler, hem kan emmek ve hem de birçok hastalık etkenini kan emdiği konağa nakletmek suretiyle zararlı etki gösterirler. Kenelerin 200'den fazla patojeni nakledebilme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu patojenlerden protozoan parazitler, Türkiye'nin de içerisinde yer aldığı tropikal ve subtropikal iklim kuşağındaki bölgelerde yaygın olarak bulunmakta ve evcil ve yabani hayvanlarda klinik ve subklinik enfeksiyonlar oluşturarak ölüm ve verim kayıplarına neden olmaktadır (1, 2). Keneler tarafından nakledilen protozoan parazitlerin başında *Babesia* ve *Theileria* türleri gelmektedir.

Ixodidae ailesindeki keneler tarafından transtadial ve transovarial olarak nakledilen *Babesia* türleri, evcil ve yabani omurgalıların eritrositlerine yerleşerek gelişmelerini sürdürürler ve konaklarında yüksek ateş, intravasküler hemoliz, anemi, hemoglobüri ve hemoglobinemi ile karakterize hastalık tablosu oluştururlar (3). *Babesia* türlerinden *Babesia ovis*, *B. motasi*, *B. crassa*, *B. taylori* ve *B. foliata* koyun ve keçilerde babesiosis'e neden olurlar (1, 4-10). *B. ovis*'in Avrupa, Yakın ve Orta

Doğu, Orta Asya, Kuzey, Batı ve Güney Afrika, Kuzey, Güney ve Orta Amerika'da, özellikle koyunlarda çok patojen olduğu; ateş, anemi, ikterus ve hemoglobinüri ile karakterize ciddi enfeksiyonlar oluşturduğu ve saha şartlarında duyarlı hayvanlarda %30-50 oranında ölüme sebep olduğu bildirilmiştir (1). *B. motasi*, *B. ovis*'e göre daha az patojendir. Avrupa, Kafkas Cumhuriyetleri, Hindistan, Vietnam ve Kuzey Batı Afrika'da görülür (1). İki alt türünün olabileceği ileri sürülmüş, bunlardan birisinin Kuzey Avrupa'da görüldüğü ve düşük patojenite gösterdiği, diğerinin ise Güney Avrupa ve Akdeniz havzasında bulunduğu ve yüksek patojeniteye sahip olduğu bildirilmiştir (11). *B. crassa*'nın İran'da bulunduğu ve apatojen bir tür olduğu kaydedilmiştir (12). *B. taylori* ve *B. foliata*'nın koyun ve keçilerde bulunduğu belirtilmesine rağmen (8, 9) varlıkları hala şüpheli olarak değerlendirilmektedir (11).

Babesiosis ile ilgili ilk bilgiler, Babes isimli araştırmacının 19. yüzyılın sonlarında sığırların eritrositleri içerisinde *Haematoccus bovis* olarak isimlendirdiği mikroorganizmaları keşfetmesi ve onları sığır hemoglobinürisi veya red water fever ile ilişkilendirmesi ile başlamış, daha sonra aynı araştırmacı benzer mikroorganizmaları koyun eritrositlerinde de bulmuştur (13). Smith ve Kilborne tarafından 1893 yılında sığırlarda Texas fever'in etkenine *Pyrosoma bigeminum* ismi verilmiş ve bu etkenin bir kene tarafından nakledildiği gösterilmiştir (14). Bu aynı zamanda bir protozoonun arthropod tarafından nakliyle ilgili ilk rapordur. Aynı yıl Starcovici bu parazitlere *Babesia bovis*, *B. ovis* ve *Babesia bigemina* isimlerini vermiştir (15).

B. ovis Türkiye’de ilk kez Laveran ve Nicolle tarafından tespit edilmiştir. Bu gelişmenin ardından Çelebi 1912 yılında İstanbul’da, Abravanel ve Raif 1930 yılında Bursa’da, Ekrek 1930 yılında Etlik’te, Lestoquard ve Ekrem 1931 yılında Karacabey harasında, Tüzdil 1936 yılında Orta Anadolu’da, Özcan 1961 yılında Ankara’da koyunlarda babesiosisin yaygın olduğunu bildirmişlerdir (16).

Babesia türlerinin Systema Naturae 2000’e göre sistematikteki yerleri aşağıdaki gibidir (17).

Biota (Canlılar)

Domain: **Eukaryota** Chatton,1925

Kingdom: **Protozoa** (Goldfuss,1818) R.Owen, 1858

Subkingdom: **Bicilialata**

İnfrakingdom: **Alveolata** Cavalier-Smith, 1991

Phylum: **Myxozoa** Cavalier-Smith ve Chao, 2004

Subphylum: **Apicomplexa** Levine, 1970

Class: **Aconoidasida** Mehlhorn, Peters ve Haberkorn, 1980

Order: **Piroplasmorida** Wenyon, 1926

Family: **Babesiidae** Poche, 1913

Genus: **Babesia** Starcovici, 1893

Kısaca *Babesia* türleri, Piroplasmorida dizisi ve Babesiidae ailesinde klasifiye edilen, yalnızca eritrositlere yerleşen ve eritrositlerde şizogoni yerine tomurcuklanma yoluyla çoğalabilen, hemozoinden yoksun apicomplexan parazitlerdir (18).

Babesia türleri heteroksen gelişme gösterirler. Gelişmeleri omurgalı konaklar ile Ixodidae ailesine bağlı mera kenelerinde olur. *Babesia* türleri, enfekte kenelerin konaklarından kan emmesi esnasında nakledilirler. Parazitler vektör kenenin bütün evrelerinde (yumurta, larva, nimf ve erişkin) gelişmelerine devam edebilirler. Vektör keneler tarafından hem transtadial hem de transovarial olarak nakledilebilirler (19). Enfekte keneler konaktan kan emerken tükürük salgısı ile birlikte sporozoitleri de konağa verirler. Kene tarafından konağa inokule edilen sporozoitler, doğrudan eritrositlere girerler. Sporozoitlerin eritrositlere girişinde, ön kısımlarında bulunan roptri, mikronem, konoid, polar halka ve subpellikuler mikrotübüllerden oluşan apikal kompleks organelleri rol alır (20, 21). Sporozoitlerin eritrositlere girişi endositosisle olur. Sporozoitin temas ettiği eritrositin yüzeyinde, önce aktin ve myozinin rol aldığı mekanizma ile bir invaginasyon meydana gelir. Bunu takiben sporozoitler, direkt olarak (vakuol oluşturmadan) konak eritrositine girerler. Bu şekilde eritrosit içine giren sporozoitler, trofozoit şekline dönüşürler. Olgunlaşan trofozoit, merogoniye benzer şekilde ikiye veya dörde bölünerek çoğalır. Bölünme genellikle merozoit sayısı iki olunca sona erer. Ancak *B. crassa*'da olduğu gibi bazen merozoit sayısı dördü de bulabilir. Meydana gelen merozoitler de aynı şekilde sağlam eritrositlere penetre olur ve bu şekilde eritrositleri

enfekte ederler (3, 7, 22-24). Enfeksiyon konağın ölmesine veya immun sistemin olayı baskılamasına kadar devam eder (25).

Vektör keneler, *Babesia* türleri ile enfekte konaktan kan emerken enfekte eritrositlerle birlikte etkenleri de alırlar. Alınan etkenlerin çoğu parçalanır. Ancak bazı özel evreler (pregametosit) gametositlere dönüşmek üzere kene bağırsağında gelişimlerine devam ederler (24). Bu evreler önce gametositlere daha sonra makro ve mikro gametlere dönüşürler (26). Mikro gamet, makrogamet ile birleşerek zigotu oluşturur (24). Zigotun çoğa bölünmesiyle vermiküller (kinet) oluşur. Hareket yeteneğine sahip olan kinetler, orta bağırsağı geçerek hemolenfe intikal ederler, ovaryumlar dahil olmak üzere birçok organı istila ederler. Ovaryumlara gelen kinetler, burada üretilen yumurtalara ve bu yumurtalardan çıkan larvalara intikal ederler. Böylece parazitler, transovarial nakil olarak ifade edilen bir nesilden diğer bir nesle aktarılmış olurlar (22, 24, 27). Tükürük bezlerine gelen kinetler, gelişmelerini sürdürerek polimorf yapıdaki sporontlara dönüşürler. Sporontun çoğa bölünmesi sonucu sporozoitler meydana gelirken, kene de gömlek değiştirmek suretiyle bir sonraki gelişme safhasına (larvadan nimfe, nimften erişkine) geçer. Tükürük bezlerinde gelişmesini tamamlayan sporozoitler, kenenin kan emmek üzere tutunduğu yeni duyarlı konağa verilir ve parazitin vektör kenedeki yaşam döngüsü tamamlanmış olur. Böylece vektör kene, herhangi bir gelişme döneminde enfekte konaktan aldığı *Babesia* etkenlerini bir sonraki gelişme döneminde diğer bir duyarlı konağa aktarmış olur (transtadial nakil) (3, 24).

Babesia türleri konak spesifitesine sahiptir. Buna rağmen bazı *Babesia* türlerinin (*Babesia divergens*, *Babesia bovis*, *Babesia microti*) hem hayvanlarda hem de insanlarda hastalık oluşturduğu bilinmektedir (28).

Babesia soyundaki protozoonlar büyük ve küçük *Babesia* türleri olarak gruplandırılır. Küçük *Babesia* türleri yuvarlak, tek armut ve belirsiz bir açıya sahip çift armut şeklindedir. Büyük *Babesia* türleri ise yuvarlak, oval, tek armut ve belirgin bir açısı olan çift armut şeklinde bulunurlar. *Babesia* türlerinin piroplazmaları gelişme dönemlerine göre halka, ameboid ve armut biçimini alırlar. Çift armut şekilleri birbirinden ayrılıp, hücreyi terk ederek diğer alyuvarlara girer ve tekrar yuvarlak bir şekil alırlar (5, 29).

B. ovis piroplazmaları 1-2,5 µm büyüklüğündedir ve küçük *Babesia* türlerindendir. *B. ovis* genellikle yuvarlak, anaplazmoid ve eliptik şekilde olup tek veya çift armut formunda görülürler ve eritrositlerin kenar kısımlarına yerleşirler. Anaplazmoid formlar hariç diğerlerinde vakuol parazitin ortasında belirgin olarak görülür. *B. motasi* büyük *Babesia* türlerinden olup, 2,5-4 x 2 µm büyüklüğündedir. Kan frotilerinde genellikle tek veya çift armut formunda görülürler. Çift armut formların arasındaki açı dardır. Bu türün yuvarlak ve ameboid formları da vardır (5, 30). *B. crassa*'da büyük *Babesia* türlerindendir. Büyüklüğü 2-3 µm kadardır. Genellikle eritrosit içerisinde 4 merozoit birlikte bulunur (7).

B. ovis'in en önemli arakonağı *Rhipicephalus bursa*'dır. Bununla beraber *R. turanicus*, *Hyalomma excavatum*, *Ixodes ricinus* ve *I. persulcatus* tarafından da nakledilebileceği belirtilmiştir (3, 29, 31-33). *B.*

motasi'nin vektörü *H. punctata*'dır (4, 6). *B. crassa*'nın vektörü ise bilinmemektedir.

Theileriosis, evcil ve yabani hayvanlarda *Theileria* soyuna bağlı türler tarafından oluşturulan, lenf yumrularında büyüme, anemi ve yüksek ateş ile karakterize, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden ve Ixodidae ailesine bağlı kene türleri tarafından transtadial olarak nakledilen protozoer bir hastalıktır. Theileriosis, sığır, koyun ve keçi gibi ruminantlarda önemli ekonomik kayıplara neden olur. Koyun ve keçilerde *Theileria lestoquardi* (Syn: *Theileria hirci*), *T. ovis*, *T. separata*, *T. uilenbergi* ve *T. luwenshuni* türleri bulunmuştur (1, 34-38). Bu türlerden *T. lestoquardi*, *T. uilenbergi* ve *T. luwenshuni*'nin yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden klinik, *T. ovis* ve *T. separata*'nın ise subklinik enfeksiyonlara neden olduğu ifade edilmiştir (1, 34, 35, 37-40). Koyun ve keçi theileriosisi, Ortadoğu, Akdeniz havzası, Güney Avrupa, Asya, Kuzey Afrika, Hindistan ve Çin'i içine alan geniş bir coğrafyada yaygın olarak görülür (5).

Theileria etkenleri ilk defa Robert Koch tarafından, Doğu Afrika'da sığır eritrositleri içerisinde tespit edilmiş ve küçük piroplasma olarak ifade edilmiştir. Kafkasya sığırlarında 1903 yılında Dschunkowsky ve Luhs isimli araştırmacılar tarafından keşfedilen hastalığa tropikal piroplasmose, etkenlere ise *Piroplasma annulatum* adı verilmiştir. Sonraki yıllarda eritrositler içindeki etkenler *Theileria annulata* olarak adlandırılmış, Portekizli araştırmacılar Borges, Bettencourta ve Francia tarafından 1907 yılında *T. annulata*'nın *Piroplasma bigeminum* ile mukayesesi yapılmış, iç organlarda *P. annulatum*'un şizontlarının görülmesi üzerine, bu küçük

organizmalar *Theileria* adı verilen yeni bir soy içinde değerlendirilmiştir. Daha sonra yapılan araştırmalar, bu soyda bulunan türlerin Theileridae ailesi içerisinde değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur (41).

Türkiye’de koyun ve keçi theileiosis ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır ve daha çok perifer kan frotilerinin mikroskopik bakısına dayanmaktadır (16, 42, 43). Karacabey harasında 1931 yılında yapılan bir çalışmada koyunlarda *T. ovis* enfeksiyonları belirlenmiştir (43). Ankara yöresinde değişik zamanlarda hastalanıp ölen 14 koyun ve 1 keçinin muayenesinde saptanan piroplasm formların *T. lestoquardi* olduğu ifade edilmiştir (44). Türkiye genelini kapsayan bir çalışmada koyun ve keçilerde *T. ovis* enfeksiyonları belirlenmiş, keçilerdeki parazitin *T. lestoquardi* olabileceği belirtilmiştir (42).

Theileria türlerinin Systema Naturae 2000’e göre sistematikteki yerleri aşağıdaki gibidir. (17)

Biota (Canlılar)

Domain: **Eukaryota** Chatton,1925

Kingdom: **Protozoa** (Goldfuss,1818) R.Owen, 1858

Subkingdom: **Bicilialata**

İnfrakingdom: **Alveolata** Cavalier-Smith, 1991

Phylum: **Myxozoa** Cavalier-Smith ve Chao, 2004

Subphylum: **Apicomplexa** Levine, 1970

Class: **Aconoidasida** Mehlhorn, Peters ve Haberkorn, 1980

Order: **Piroplasmorida** Wenyon, 1926

Family: **Theileriidae** du Toit, 1918

Genus: **Theileria** Bettencourt, 1907

Theileria türlerinin biyolojileri türler arasında çok küçük farklılıklar göstermekle birlikte temelde aynı olup, Ixodidae ailesindeki keneler ile sığır, koyun, keçi gibi çeşitli memeli hayvanlar arasında geçer. Bu türler Ixodidae ailesinde yer alan kenelerde gametogoni ve sporogoni, memeli hayvanlarda ise şizogoni yoluyla çoğalır. Vektör keneler *Theileria* etkenlerini larva veya nimf aşamasında enfekte bir konaktan kan emerken alırlar ve bir sonraki gelişim aşamalarında kan emdikleri duyarlı hayvanlara naklederler (transtadial nakil). Buna göre *Theileria* etkenleri vektör kenenin nimf ya da erişkin döneminde nakledilebilir. Erişkin dönemde *Theileria* ile enfekte bir konaktan kan emen kene, bu konaktan aldığı etkenleri ovaryumlarına intikal ettiremezler, bu sebeple transovarial nakil söz konusu değildir (24).

Larva ve nimf safhasında enfekte hayvandan kan emen keneler, kanla birlikte eritrositler içindeki piroplasm veya gametosit olarak isimlendirilen etkenleri de alırlar. Enfekte konaktan kan emip doyan kene bir sonraki gelişme dönemine geçebilmek için gömlek değiştirirken, kenenin bağırsağındaki enfekte eritrositlerden piroplasm formlar serbest

kalır. Bu formlardan özellikle halka şekilli olanlardan bir kısmı değişime uğrayarak mikrogamontu oluşturur ve bundan da iplik şeklinde mikrogametler şekillenir. Diğer piroplasm formların değişikliğe uğraması ile makrogamontlar ve bunlardan da makrogametler oluşur. Mikrogamet ile makrogamet in birleşmesi neticesinde zigot şekillenir. Hareketli olan bu zigota ookinet adı verilir. Ookinet kenenin sindirim sistemi duvarını aşarak hemolenfe ulaşır. Kenenin gömlek değiştirmesini takiben ookinetler tükürük bezleri asini hücrelerinin sitoplasmasına geçerek burada sporogoni yoluyla çoğalırlar ve enfektif sporozoitleri meydana getirirler (24).

Enfekte keneler tarafından kan emme esnasında konağa verilen sporozoitler, bölgesel lenf yumrularına taşınırlar ve lenfositlere girerek, şizontları oluştururlar. Bu esnada konak hücreyi de bölünmeye teşvik ederler. Önce makroşizontlar, bunlardan mikroşizontlar ve neticede merozoitler şekillenir. Merozoitler de eritrositlere girerek piroplasm formlarını oluştururlar (24).

Theileria türleri eritrositler içinde 0,5-2 µm büyüklüğünde yuvarlak, oval, batone, anaplasmod, armut ya da çomak şeklinde bulunurlar (45).

T. lestoquardi eritrositler içerisinde yuvarlak, oval, batone ya da anaplasmod formlarda bulunur. Etkenlerin %80'inin yuvarlak ve oval formlardan oluştuğu ifade edilmiştir (46). Yuvarlak formlar 0,6-2 µm çapında, oval formlar ise 1,6 µm uzunluğundadır. Küçük batone formlar 0,5-1,5 µm, anaplasmod şekiller 0,5-1,2 µm çapındadır. Parazitin sitoplazması Giemza ile boyanmış preparatlarda açık mavi, çekirdeği

kırmızı mor renkte görülür. Çekirdek, halka formların bir kenarında, diğer formların ise geniş kısmında bulunur. Halka ve oval şekillerin ortasında bir vakuol yer alır. Anaplazmoid şekillerde sitoplazma güçlükle ayırt edilmektedir. *T. lestoquardi*'nin şizont formlarına lenf yumruları, dalak ve serbest lenfoblastoid seri hücrelerinde rastlanır. Şizontların büyüklüğü ortalama 8 µm olup, kırmızımsı mavi renkte, 1-2 µm çapındadır ve 1-80 adet granül ihtiva ederler. Bunlardan 1-2 µm çapındaki merozoitler oluşur (45).

T. ovis'in *piroplasm* formları *T. lestoquardi*'ye benzer ancak *T. lestoquardi*'de görülen çomak formlarına bu türde rastlanmaz. *T. ovis* ile enfekte eritrositlerde sitoplazma içinde silik bir peçe bulunur (45, 47). *T. ovis* enfeksiyonlarında eritrositlerin %2'sinden daha azı enfektedir. Bu türün şizontları lenf yumrusu, dalak ve karaciğer ile serbest lenfoblastoid hücrelerde bulunur. Bunları belirlemek çok zordur ancak çok dikkatli muayene edildiği takdirde, lenf yumrularından hazırlanan preparatlarda görülebilirler (45).

T. separata yuvarlak, oval, bazen çomak şeklinde *piroplasm* formlara sahiptir. *T. separata* ile enfekte eritrositlerin bir kenarlarındaki çöküntüde iyi oluşmuş bir peçe ve enfekte eritrositin içinde de nokta şeklinde bir leke bulunur (48).

Theileria türleri, Ixodidae ailesine bağlı keneler ile biyolojik olarak nakledildiği gibi (5, 49), enfekte hayvanlara ait kan, lenfoid doku emülsiyonu ve enfekte doku kültürü hücrelerinin inokülasyonu ile mekanik olarak da bulaşabilmektedir (50-52). *T. lestoquardi*'nin saha şartlarında

naklinde rol oynayan kene türü *Hyalomma anatolicum*'dur (1, 47). Bununla beraber *H. anatolicum*'un görülmediği Sudan'ın Blue Nil bölgesinde, koyunlarda IFAT ile %14 oranında *T. lestoquardi*'ye karşı seropozitiflik belirlenmiş olması (53) bu türün başka kene türleri tarafından nakledilebileceğini de düşündürmektedir. Deneysel çalışmalarda *T. lestoquardi*, *H. anatolicum* ve *Rhipicephalus* spp., ile nakledilmiştir (34, 54). *T. ovis* Dünya'nın farklı coğrafik bölgelerinde farklı kene türleri tarafından nakledilmektedir. *T. ovis*'in Güney Afrika'da *R. evertsi* (55), *R. bursa* (56), *R. haemaphysaloides* (57), *H. anatolicum* (47), İngiltere'de *H. punctata* (39), eski Sovyetler Birliğinde *R. bursa*, *Dermacentor sylvarum*, *H. sulcata* ve *Ornithodoros lahorensis* tarafından nakledildiği bildirilmiştir (5, 52). Deneysel olarak *R. evertsi* (55, 58), *H. punctata* (39), *R. haemaphysaloides* (57), *H. anatolicum* (47, 59) ve *R. bursa*'nın (56) *T. ovis*'i transtatidal yolla naklettiği ortaya konmuştur. *T. ovis* ile enfekte bir koyun üzerinde beslenen aç olgun *H. anatolicum*'un tükürük bezi asini hücrelerinde Methyle Green Pyronin boyama metodu ile *Theileria* sporoblastları tespit edilmiş (60), koyunlar üzerinden toplanan *R. bursa*'nın tükürük bezi asini hücrelerinde ise PZR ile *T. ovis*'in sporozoitleri ortaya konmuştur (61). Afrika'da koyunlarda görülen bir tür olan *T. separata*'nın *R. evertsi* ile nakledildiği bildirilmiştir (48).

Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar, koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* soyuna bağlı yeni genotiplerin varlığını ortaya koymuştur. İspanyada reverse line blotting (RLB) yöntemi ile ilk defa *Theileria* sp. OT1 ve *Theileria* sp. OT3 genotipleri bildirilmiştir (62).

Bunlardan *Theileria* sp. OT1'in daha önce Çin'de bildirilen *Theileria* sp. China 1 (günümüzde *T. luwenshuni* olarak isimlendirilmektedir) ile 18S ssu rRNA gen düzeyinde %99,6 oranında benzer oldukları belirlenmiştir. *Theileria* sp. OT3'ün ise diğer türlerden genotipik olarak farklı olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'de Doğu Anadolu bölgesinde koyun ve keçilerde yine aynı yöntemle yapılan çalışmada diğer *Theileria* türlerinden farklı bir genotip tespit edilmiş ve *Theileria* sp. MK olarak adlandırılmıştır (63). *Theileria* sp. OT1, *Theileria* sp. OT3 ve *Theileria* sp. MK genotiplerinin patojeniteleri ve vektörleri ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Çin'de koyun ve keçilerde yapılan bir çalışmada, diğer *Babesia* türlerinden morfolojik ve genetik olarak farklı yeni bir *Babesia* genotipi tespit edilmiş ve *Babesia* sp. Xinjiang olarak adlandırılmıştır (64). Yine aynı ülkede son zamanlarda yeni birçok *Babesia* genotipi tanımlanmıştır (65-69). Bu genotipler 18S rRNA ve ITS gen sekanslarına göre *B. motasi* [(*Babesia* sp. BQ1 (Lintan), *Babesia* sp. BQ1 (Ningxian), *Babesia* sp. (Liaoning), *Babesia* sp. (Tianzhu), *Babesia* sp. (Madang), *Babesia* sp. (Hebei)] ve *Babesia* sp. Xinjiang olarak iki gruba ayrılmıştır (69, 70). Bu genotiplerden *Babesia* sp. BQ1 (Ningxian)'in *Haemaphysalis longicornis* tarafından nakledildiği, Avrupa'daki *B. motasi*'ye benzer morfolojide olduğu ve koyun ve keçilerde son derece patojen olduğu belirtilmiştir (68). *Babesia* sp. BQ1 (Lintan) ise koyunlara deneysel olarak *H. qinghaiensis* ve *H. longicornis* tarafından nakledilmiştir (71). *Babesia* sp. Xinjiang'ın *B. motasi* ve *B. crassa*'dan morfolojik olarak farklı olduğu ve koyunlarda düşük patojenite gösterdiği ifade edilmiştir (64, 67).

Türkiye’de evcil ve yabani hayvanlarda keneler yaygın olarak bulunmaktadır. Kenelerin günümüze kadar üç ailede yaklaşık 899 türü (Ixodidae: 713 tür, Argasidae: 185 tür, Nuttalliellidae: 1 tür) belirlenmiştir (72). Türkiye’de yapılan çalışmalarda ise 2 ailede 32 kene türü (Ixodidae: 28 tür, Argasidae: 4 tür) tespit edilmiş (73), bu türlerin *Ixodes hexagonus*, *I. ricinus*, *Boophilus kohlsi*, *B. annulatus*, *R. bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *D. marginatus*, *D. niveus*, *H. aegyptium*, *H. anatolicum*, *H. excavatum*, *H. detritum*, *H. dromedarii*, *H. marginatum*, *H. rufipes*, *Haemaphysalis concinna*, *H. inermis*, *H. numidiana*, *H. parva*, *H. punctata*, *H. sulcata*, *Amblyomma variegatum*, *Argas persicus*, *A. reflexus*, *Ornithodoros lahorensis*, *Otobius megnini* olduğu bildirilmiştir (73-76).

Türkiye’de koyun ve keçilerde bulunan kene türlerini ve bu türlerin mevsimsel aktivitelerini belirlemeye yönelik çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Malatya ve bazı Güney Doğu Anadolu illerinde koyun ve keçilerde Ixodidae ailesine bağlı 10 farklı türün bulunduğu enfestasyon oranlarının koyunlarda %29,1 ve keçilerde %21,5 olduğu bildirilmiştir (77). Güney Marmara bölgesinde koyunlarda 13, keçilerde 12 tür saptanmış, koyunlarda %42,35, keçilerde ise %59,33’lük enfestasyon oranı saptanmıştır (78). Kayseri yöresinde koyun ve keçilerde 8 tür belirlenirken, enfestasyon oranlarının koyun ve keçilerde sırası ile %32 ve %6 olduğu kaydedilmiştir (79), Sivas ili Zara yöresinde koyunlarda 6, keçilerde 7 tür belirlenmiş, koyunlarda %24 ve keçilerde %19,9’luk bir enfestasyon oranı saptanmıştır (80). Çankırı yöresinde koyun ve keçilerde 7 türün bulunduğu ve enfestasyon oranlarının koyunlarda %42,96, keçilerde ise %54,45

olduğu kaydedilmiştir (81). Van yöresindeki koyunlarda %43,51 oranında enfestasyon belirlenmiş ve dört soya ait 11 farklı kene türü tespit edilmiştir (82). Elazığ bölgesinde koyun ve keçilerde çoğunluğu *Rhipicephalus* ve *Haemaphysalis* soylarına ait 11'i Ixodidae, biri Argasidae ailesinden olmak üzere 12 kene türünün varlığı ortaya konmuş ve enfestasyon oranlarının %20 ile %40 arasında değiştiği ifade edilmiştir (83). Burdur yöresinde yedi soya ait 10 kene türü saptanmış, en fazla *R. turanicus*'un, en az *I. ricinus* ve *Hyalomma* türlerinin bulunduğu bildirilmiş, enfestasyon oranlarının koyunlarda %25,4 ve keçilerde %15,8 olduğu ortaya konmuştur (84). Ankara yöresi koyunlarında kene enfestasyon oranının %50 olduğu ve bu hayvanlarda çoğunlukla *Rhipicephalus* ve *Haemaphysalis* daha az olarakta *Hyalomma*, *Dermacentor* ve *Ixodes* soylarına bağlı kene türlerinin bulunduğu belirlenmiştir (85). Kayseri yöresinde koyunlarda 7 farklı tür bulunmuş, %21 oranında enfestasyon saptanmıştır (86).

Van yöresi koyunlarında *Rhipicephalus* spp. ilkbahar, yaz ve sonbaharda, *Haemaphysalis* spp. ise sonbahar, kış ve ilkbaharda tespit edilmiştir (82). Elazığ yöresinde 1979-1980 yılları arasında 2517 koyun ve 2125 keçi muayene edilmiş, *B. annulatus*'un ilkbahar, *Hyalomma*, *Rhipicephalus* ve *Dermacentor* türlerinin ilkbahar ve yaz, *Haemaphysalis* türlerinin ilkbahar sonbahar ve kış mevsiminde bulunduğu tespit edilmiştir (83). Zara yöresinde koyun ve keçilerde *Dermacentor* türleri sonbahar, *Haemaphysalis* türleri ilkbahar ve kış, *B. annulatus* ilkbahar, *Hyalomma* ve *Rhipicephalus* türleri ise yaz aylarında tespit edilmiştir (80).

Karadeniz bölgesinde koyun ve keçilerde kene türleri ile bu türlerin mevsimsel aktivitelerine ilişkin bulgular sınırlıdır. Kelkit vadisi olarak isimlendirilen ve Tokat ile bazı ilçelerini de içine alan bir bölgede sığır, koyun ve keçilerden 1015 erişkin kene toplanmış ve bunların *R. bursa*, *H. marginatum*, *B. annulatus* ve *H. sulcata* olmak üzere 4 farklı türden oluştuğu, en yaygın türlerin *R. bursa* (%47,68) ve *H. marginatum* (%46,40) olduğu görülmüştür (87). Giresun, Trabzon ve Rize illerinde insanlara tutunan kene türlerinin *I. ricinus*, *I. hexagonus*, *H. marginatum*, *H. punctata*, *H. sulcata*, *D. marginatus* ve *R. bursa* ve en yaygın türün *I. ricinus* olduğu tespit edilmiştir (88). Samsun yöresinde koyun ve keçilerde *I. ricinus*, *R. sanguineus*, *R. bursa*, *H. punctata*, *H. sulcata*, *H. concinna*, *D. marginatus* ve *D. niveus* türlerinin varlığı tespit edilmiş; *I. ricinus*'un Haziran, Kasım ve Aralık aylarında, *R. sanguineus* ve *R. bursa*'nın Mart, Nisan, Mayıs Haziran ve Temmuz aylarında, *H. punctata*, *H. sulcata* ve *H. concinna*'nın Ağustos, Eylül, Kasım ve Aralık aylarında, *D. marginatus* ve *D. niveus*'un Eylül, Kasım ve Nisan aylarında hayvanlar üzerinde görüldüğü bildirilmiştir (89).

Türkiye'de *Babesia* ve *Theileria* türlerinin varlığı ve yayılışına ilişkin farklı yöntemler kullanılarak çeşitli araştırma ve yayınlar yapılmıştır. *B. ovis* ilk kez 1899 yılında Nicolle ve Laveran tarafından saptanmış (16), daha sonra mikroskopik bakı ve serolojik yoklamalarla Türkiye'nin çeşitli yerlerinde koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin varlığı ve yayılışı ortaya konmuştur.

Kayseri yöresinden 192'si koyun, 47'si keçi olmak üzere toplam 239 küçük ruminantın perifer kan frotileri incelenmiş, 34'ü koyun (%17,70) ve 3'ü keçi (%6,38) olmak üzere toplam 37 hayvanın (%15,48) *B. ovis* ile enfekte olduğu tespit edilmiş, hiçbir örnekte *B. motasi*'ye rastlanmamıştır (90). Aynı yöreden 250 koyun ve 50 keçinin perifer kan frotilerinin mikroskopik muayenesinin yapıldığı diğer bir çalışmada (79), 46 koyun ve 4 keçide *Theileria* sp. tespit edilmiştir. Orta, Doğu ve Güney Anadolu gibi Türkiye'nin değişik coğrafik bölgelerinden *Theileria* şüpheli 687 koyun ve 89 keçi muayene edilmiş, serolojik olarak koyunların %60,26'sı, keçilerin 8,99'u, mikroskopik olarak ise koyunların %37,55'i ve keçilerin %5,62'si *T. ovis* yönünden pozitif bulunmuş, *T. lestoquardi*'ye rastlanmadığı bildirilmiştir (91). Çankırı yöresinden 128 koyun ve 66 keçiye ait sürme kan frotisi mikroskopik olarak incelenmiş, 27 koyun ve 8 keçide *Theileria* spp. 39 koyun ve 10 keçide ise *B. ovis* belirlenmiştir (81). Türkiye'nin farklı illerinden *B. ovis*'in mikroskopik ve serolojik prevalansı araştırılmış; seroprevalansının Malatya ve yöresinde %55,9, Elazığ yöresinde %45, Afyon yöresinde %51,96, Konya yöresinde %42,14, Urfa ve yöresinde %41,2; mikroskopik prevalansının ise Malatya ve yöresinde %1,8, Afyon yöresinde %0,49, Konya yöresinde %11,47, Urfa ve yöresinde %1,82 olduğu görülmüştür (92-96).

Karadeniz bölgesinde koyun ve keçi theileriosis ve babesiosisine ilişkin veriler mikroskopik ve serolojik çalışmalara dayanmaktadır (97-99). Samsun Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne, 1985-2006 yılları arasında kan parazitleri yönünden gönderilen perifer kan ve organ

frotilerinin mikroskopik inceleme sonuçlarını içeren verilerin yer aldığı bir retrospektif çalışmada, 46 *B. ovis*, 4 *B. motasi*, 18 *Babesia* sp., 4 *Anaplasma ovis* ve 4 *T. ovis* olgusu bildirilmiştir. Bu olguların bölge illerine dağılımına bakıldığında *Babesia* türlerinin Sinop, Samsun, Amasya, Tokat ve Sivas'tan, *T. ovis*'in ise Samsun, Çorum ve Amasya'dan gönderilen preparatlarda belirlendiği anlaşılmıştır (97). Bu verilerin dışında Karadeniz bölgesine ilişkin sadece Samsun iline ait bir çalışmaya rastlanmış, serolojik yöntemle yapılan bu araştırmada 141 koyunun 101 tanesinin *B. ovis*'e karşı seropozitif bulunduğu ortaya konmuştur (98, 99).

Theileriosis ve babesiosisin teşhisi akut vakalarda klinik bulgular ve Giemsa ile boyanmış kan frotilerinin mikroskopik muayenesi ile yapılmaktadır (100, 101). *Theileria* ve *Babesia* türleri ile oluşan enfeksiyonlarda, hastalığı atlatan hayvanlar portör duruma geçerler. Bu hayvanların populasyon içindeki oranı, hastalığın epidemiyolojisi açısından önemlidir (102). Portör hayvanların tespitinde mikroskopik yöntemlerin yetersiz kaldığı (47), serolojik testlerde ise (92, 96, 103-107) yanlış pozitif ve negatif sonuçların söz konusu olabileceği ileri sürülmüştür (108-110). Bu sebeplerden dolayı *Theileria* ve *Babesia* enfeksiyonlarının epidemiyolojilerini belirlemeye yönelik araştırmalarda moleküler tanı yöntemlerinin kullanılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Son yıllarda *Theileria* ve *Babesia* türlerinin teşhisinde parazitin DNA'sını tespit etmeye yönelik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Multiplex PZR, Nested PZR ve Touchdown PZR gibi amplifikasyon yöntemleri ile PZR temelli bir metot olan ve birçok türün eş zamanlı teşhisine olanak sağlayıp yeni tür /

genotiplerin keşfedilmesine öncülük eden Revers Line Blotting (RLB) yöntemi kullanılmaya başlanmıştır (36, 62, 111-117).

Türkiye’de koyun theileriosisinin moleküler yöntemlerle belirlenmesine yönelik ilk çalışma Doğu Anadolu bölgesinde Aktaş ve ark. tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada 218 koyuna ait kan frotisi mikroskopik, gDNA’lar ise önce PZR ile *Theileria* spp. yönünden incelenmiş, pozitif bulunan 90 örnek yeniden *T. lestoquardi* yönünden PZR ile incelenmiştir. Hiçbir örnekte *T. lestoquardi* tespit edilememiştir (118). Doğu Anadolu bölgesinden 300 koyun ve 100 keçide *Babesia* enfeksiyonlarını belirlemeye yönelik bir çalışmada (112) mikroskopik muayene ile 6 örnekte (%1,5) *Babesia* piroplazmaları tespit edilirken, *B. ovis* spesifik PZR ile 32 koyun ve 1 keçide (%8,25) *B. ovis* tespit edilmiştir. Aynı araştırmacılar Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinden 677 koyun ve 142 keçinin kullanıldığı bir çalışmada mikroskopik bakı ile koyunların %18,29’unda, keçilerin ise %2,88’inde *Theileria* spp. piroplazmaları belirlerken PZR ile koyunların %58,79’unda, keçilerin ise %11,27’sinde *T. ovis* tespit etmişlerdir (119).

Klasik PZR ile birden fazla türün eş zamanlı olarak teşhis edilememesinden dolayı, aynı anda 45 farklı türün teşhisine olanak sağlayan ve ilk defa 1995 yılında aynı kenede bulunabilen dört *Borrelia* türünün ayırıcı teşhisi için kullanılmış olan (120) RLB yöntemi geliştirilmiştir. Parazitoloji alanında kullanımı her geçen gün artarak devam eden bu yöntem *Theileria* ve *Babesia* türlerinin teşhisinde de başarılı bir şekilde kullanılmıştır (62, 63, 116, 117, 121).

RLB yöntemi Türkiye’de koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin tespiti için ilk defa Kayseri yöresinde kullanılmış, koyunlarda %2,7 oranında *B. ovis*, %34,2 oranında da *T. ovis* enfeksiyonu tespit edilmiştir (122). Daha sonra Doğu Anadolu bölgesinden 705 koyun ve 215 keçiye ait kan örnekleri *Theileria* ve *Babesia* türleri yönünden RLB ile araştırılmış ve *B. ovis* (%5,43), *T. ovis* (%34,56), *Theileria* sp. MK (%1,30) ve *Theileria* sp. OT3 (%0,43)’ün varlığı ortaya konmuştur (63). *Theileria* sp. MK genotipi ilk olarak bu çalışmada tanımlanmıştır. Bu bölgede koyun ve keçilerde en yaygın türün *T. ovis* olduğu (%50,55), *T. lestoquardi*’nin ise bulunmadığı anlaşılmıştır (118, 119). Kayseri ili Yeşilhisar yöresindeki koyun ve keçilerdeki *Theileria* ve *Babesia* türlerinin belirlenmesi amacıyla rastgele seçilen 200 koyun ve 100 keçiye ait kan frotileri mikroskopik olarak, gDNA’lar ise RLB testi ile *T. ovis* ve *B. ovis* problemleri kullanılarak incelenmiştir. Yörede *B. ovis*’in moleküler prevalansı %3,7 olarak tespit edilirken *T. ovis*’in %37,6 oranında bulunduğu belirlenmiştir (121). Orta Anadolu bölgesindeki Kayseri, Sivas ve Yozgat illerinden 421 koyun ve 152 keçiye ait kan örnekleri RLB ile incelenmiş, *B. ovis* %2,6, *T. ovis* %33,9 oranında belirlenmiştir (123).

Koyun ve keçilerde keneler ve kenelerle bulaşan hastalıklar ciddi verim kayıplarına yol açmaktadır. Karadeniz Bölgesinin, *Theileria* ve *Babesia* etkenlerine vektörlük yapan kene türleri için iklim, bitki örtüsü ve diğer coğrafik özellikleri açısından uygun olduğu aşikârdır. Ancak bölgede koyun ve keçilerde kene enfestasyonları ve kenelerin naklettiği *Theileria* ve *Babesia* türlerine ilişkin yeterli epidemiyolojik veriler bulunmamaktadır.

Bu alışma ile Karadeniz bölgesindeki bazı illerde (Bolu, Kastamonu, Çorum, Samsun, Tokat, Giresun ve Bayburt) koyun ve keçilerde enfeksiyonlara neden olan *Theileria* ve *Babesia* türlerinin RLB yöntemi ile belirlenmesi ve bu türlerin oluşturduğu hastalıklar ile ilgili epidemiyolojik verilerin elde edilerek, RLB metodunun, koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin teşhisinde mikroskopik bakı ve PZR ile karşılaştırılması ve bölgede koyun ve keçilerde bulunan kene türlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Karadeniz bölgesinde koyun ve keçilerde enfeksiyonlara neden olan *Theileria* ve *Babesia* türlerinin RLB yöntemi ile belirlenmesi ve bu türlerin oluşturduğu hastalıklar ile ilgili epidemiyolojik verilerin elde edilmesi, koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin teşhisinde RLB metodunun, mikroskopik bakı ve PZR ile karşılaştırılması ve bölgede koyun ve keçilerde bulunan kene türlerinin belirlenmesi amacı ile yapılmıştır.

4.1. Çalışma alanının ve örnek sayısının belirlenmesi

Karadeniz bölgesinin tamamını temsil etmesi planlanan bu çalışmada, illerdeki koyun ve keçi sayısı Türkiye İstatistik Kurumunun (TÜİK) 2009 yılı hayvancılık veritabanından (124) elde edilmiştir. Buna göre bölgede 1.063.666 koyun ve 139.939 keçi popülasyonunun mevcut olduğu görülmüştür. Bölgedeki illerin coğrafik dağılımı, hayvan varlığı, iklim şartları ve bitki örtüsü dikkate alınmak suretiyle Bolu, Kastamonu, Çorum, Samsun, Tokat, Giresun ve Bayburt illeri çalışma alanları olarak seçilmiştir. İllerdeki popülasyonu temsil edecek sayıda her ilden en az 121 koyun ve 32 keçi çalışmaya alınmıştır (Şekil 1., Tablo 1.).



Şekil 1: Karadeniz bölgesinde örneklerin toplandığı iller

Tablo 1: Karadeniz bölgesinde araştırma kapsamındaki iller ve 2009 yılı verilerine göre koyun ve keçi sayıları

İl	Koyun	Keçi	Toplam
Bayburt	26.513	2.571	29.084
Bolu	81.209	17.022	98.231
Çorum	91.003	12.293	103.296
Giresun	77.975	4.633	82.608
Kastamonu	57.278	13.202	70.480
Samsun	122.371	5.222	127.593
Tokat	158.652	22.153	180.805
Toplam	615.001	77.096	692.097
Bölgedeki toplam koyun ve keçi sayısı	1.063.666	139.939	1.203.605

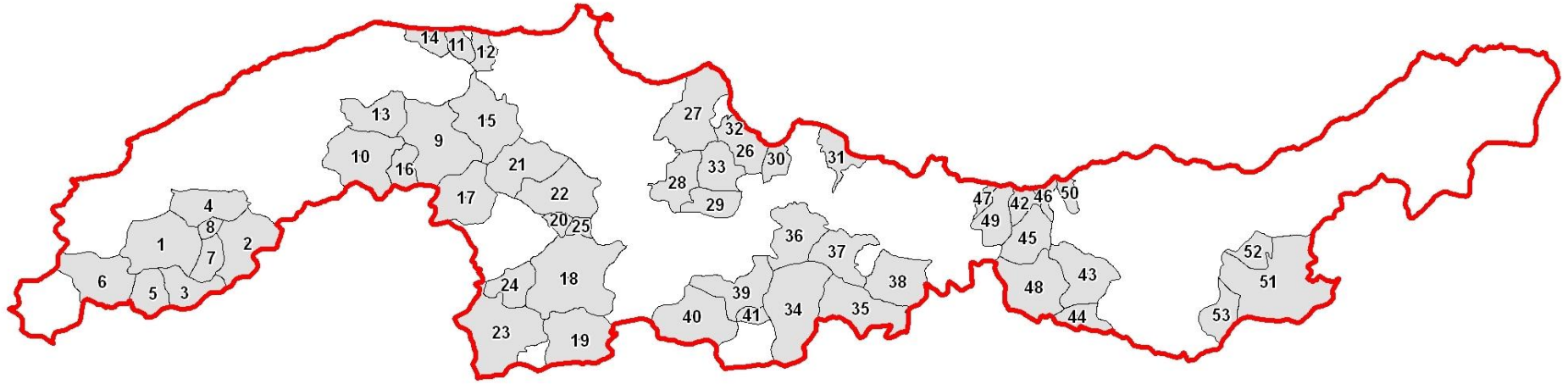
Karadeniz bölgesi Türkiye'nin en fazla yağış alan bölgesidir. Yüzölçümü 143.537 km² olup, Türkiye topraklarının %18'ini kapsar. %27'si ormanlarla örtülüdür. Diğer bölgelerle kıyaslandığında yüzölçümü yönünden 3., orman varlığı yönünden ise birinci sırada yer alır. Bölgede iki farklı iklim etkindir. Kıyı şeridi, denizden gelen nemli hava kütleleri

nedeniyle her mevsim yağış alır ve bu nedenle yazları serin, kışları ise ılık geçer. Kıyıdan itibaren yükselken dağlar, nemli hava kütlelerinin iç kesimlere geçişini engeller. Bu nedenle iç kesimlerde yağış miktarı azdır ve karasal iklim etkilidir.

4.2. Saha çalışmaları

4.2.1. Kan örneklerinin toplanması

Kan örnekleri, 2010 ve 2011 yıllarında vektör kenelerin aktif olduğu ilkbahar ve yaz aylarında Karadeniz bölgesinde yer alan Bolu (Merkez, Gerede, Kırışık, Mengen, Seben ve Mudurnu), Kastamonu (Merkez, Araç, Bozkurt, Çatalzeytin, Daday, İnebolu ve Taşköprü), Çorum (Merkez, Alaca, Dodurga, Kargı, Osmancık, Sungurlu ve Uğurludağ), Samsun (Merkez, Bafra, Havza, Ladik, Tekkeköy ve Terme), Tokat (Merkez, Almus, Erbaa, Niksar, Reşadiye, Turhal ve Zile), Giresun (Merkez, Alucra, Çamoluk, Dereli, Keşap, Piraziz ve Şebinkarahisar) ve Bayburt (Merkez, Aydıntepe, Demirözü) illerinden seçilen odaklardan toplanmıştır (Şekil 2).



Şekil 2: Karadeniz bölgesinde koyun ve keçilerden kan ve kene örneklerinin alındığı merkezler

1	Bolu*	9	Kastamonu*	18	Çorum*	26	Samsun*	34	Tokat*	42	Giresun*	51	Bayburt*
2	Gerede	10	Araç	19	Alaca	27	Bafra	35	Almus	43	Alucra	52	Aydıntepe
3	Kıbrısçık	11	Bozkurt	20	Dodurga	28	Havza	36	Erbaa	44	Çamoluk	53	Demirözü
4	Mengen	12	Çatalzeytin	21	Kargı	29	Ladik	37	Niksar	45	Dereli		
5	Seben	13	Daday	22	Osmancık	30	Tekkeköy	38	Reşadiye	46	Keşap		
6	Mudurnu	14	İnebolu	23	Sungurlu	31	Terme	39	Turhal	47	Piraziz		
7	Dörtdivan**	15	Taşköprü	24	Uğurludağ	32	Atakum**	40	Zile	48	Şebinkarahisar		
8	Yeniçağa**	16	İhsangazi**	25	Laçın**	33	Kavak**	41	Pazar**	49	Bulançak**		
		17	Tosya**							50	Espiye**		

* Merkez ilçe, **Sadece kene örneği alınmıştır.

Yukarıda adı geçen illere bağılı ilçelere gidilerek, belirlenmiş odaklardaki sürülerden rastgele seçilen koyun ve keçilerden EDTA (disodium ethylenediaminetetra-acetic acid)'lı tüplere (Greiner bio-one, Austria) yaklaşık 4 ml kan alınmıştır. Kan örneğı alınacak koyun ve keçi sayıları sürünün büyüklüğüne göre belirlenmiş, her sürüden 5-25 hayvan rastgele seçilmiş ve bunların en az bir hastalık sezonu (Nisan-Eylül ayları arası) geçirmiş olmalarına dikkat edilmiştir. Bu kanlardan mikroskobik muayene amacıyla sürme frotiler hazırlanmıştır. Örnek alınan hayvanların tür, ırk, cinsiyet, yaş ve kene enfestasyon durumları ile örneğın alındığı odak ve tarih bilgileri ilgili protokole kaydedilmiştir.

Kan örnekleri, +4 °C'yi sağlayan termos içerisinde Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Parazitoloji laboratuvarına getirilmiş, DNA ekstraksiyonunda kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Saha çalışmaları neticesinde, Bolu'dan 163 (123 koyun ve 40 keçi), Kastamonu'dan 163 (125 koyun ve 38 keçi), Çorum'dan 165 (125 koyun ve 40 keçi), Samsun'dan 158 (123 koyun ve 35 keçi), Tokat'tan 162 (123 koyun ve 39 keçi), Giresun'dan 161 (129 koyun ve 32 keçi), Bayburt'tan 156 (121 koyun ve 35 keçi) ve toplamda 1128 (869 koyun ve 259 keçi) hayvandan kan örneğı toplanmıştır. İllere göre kan örneklerinin toplandığı koyun ve keçi sayıları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: Çalışmanın yürütüldüğü illere göre kan örnekleri toplanan koyun ve keçi sayıları

Odak	Koyun	Keçi	Toplam
Bolu	123	40	163
Kastamonu	125	38	163
Çorum	125	40	165
Samsun	123	35	158
Tokat	123	39	162
Giresun	129	32	161
Bayburt	121	35	156
Toplam	869	259	1128

4.2.2. Kenelerin toplanması

Keneler; 2010 yılı Haziran, Temmuz, Ekim, Kasım ve 2011 yılı Ocak, Nisan ve Mayıs aylarında araştırmanın yürütüldüğü il ve ilçeler ile, Bolu'nun Dörtdivan, Yeniçağa, Kastamonu'nun İhsangazi, Tosya, Çorum'un Laçın, Samsun'un Atakum, Kavak, Tokat'ın Pazar, Giresun'un Bulancak ve Espiye ilçelerinden kan örneği alınan koyun ve keçilerde dahil olmak üzere 53 farklı yerleşim merkezine bağlı değişik odaklardaki koyun ve keçiler üzerinden toplanmıştır. Kene örneklerinin toplandığı merkezler Şekil 2.'de gösterilmiştir.

Hayvanların kuyruk altı, perineum, scrotum, meme, prepisyum, kulak içi, boyun altı ve sternum bölgeleri kene enfestasyonu yönünden muayene edilmiş ve toplanan keneler plastik tüpler içerisinde laboratuvara ulaştırılıp stereo mikroskop altında tür identifikasyonları yapıldıktan sonra %70'lik etanol içeren ependorf tüplere alınmıştır.

Saha çalışmaları neticesinde; 2161 koyun ve 447 keçi olmak üzere 2608 küçükbaş hayvan muayene edilmiş ve 2797 adet erişkin kene toplanmıştır. Çalışmanın yürütüldüğü illere göre kene yönünden muayene edilen hayvan sayıları ve toplanan kene sayıları Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3: Çalışmanın yürütüldüğü illere göre kene yönünden muayene edilen koyun ve keçi sayıları ve toplanan kene sayıları

İl	Muayene edilen koyun ve keçi sayısı			Toplanan kene sayısı		
	Koyun	Keçi	Toplam	Koyun	Keçi	Toplam
Bayburt	257	40	297	239	10	249
Bolu	308	97	405	277	153	430
Çorum	325	64	389	571	61	632
Giresun	280	56	336	213	84	297
Kastamonu	334	63	397	208	14	222
Samsun	323	66	391	503	144	647
Tokat	334	61	395	252	68	320
Toplam	2161	447	2608	2263	534	2797

4.3. Laboratuvar çalışmaları

4.3.1. Mikroskopik muayene

EDTA’lı kanlardan hazırlanan frotiler, metil alkol (Merck, Germany) ile 5 dk. tespit edildikten sonra %5’lik Giemsa solüsyonu ile 20-30 dk. boyanmıştır. Preparatlar boyamayı takiben çeşme suyu ile yıkanmış ve havada kuruması sağlandıktan sonra immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskopunda (Nikon, Japonya) 100’lük objektifte (x1000 büyütme)

Theileria ve *Babesia* spp. piroplasm formları yönünden incelenmiştir. Mikroskopik bakıda en az 100 mikroskop sahası incelenmiş ve bir etkenin görülmesi durumunda froti pozitif olarak değerlendirilmiştir.

4.3.2. Kene identifikasyonu

Kenelerin tür identifikasyonları, ilgili literatürlerin (74, 125) ışığında morfolojik özellikleri dikkate alınarak yapılmıştır.

4.3.3. Moleküler çalışmalar

4.3.3.1. DNA ekstraksiyonu

Kan örnekleri önce oda ısısında çözdürülmüş ve homojen hale geçmesi için 10-15 sn. vortekste bekletildikten sonra DNA ekstraksiyonuna geçilmiştir. DNA ekstraksiyonu, ya ticari DNA izolasyon kitleri kullanılarak ya da manüel yöntemle yapılmıştır. Manüel DNA ekstraksiyonu, Aktaş ve ark. (126)'nın bildirdiği şekilde yapılmıştır. Bu amaçla 125 µl kana 250 µl lysis buffer (0,32 M sucrose, 0,01 M Tris, 0,005 M MgCL₂, %1 Triton X-100, pH 7,5) ilave ettikten sonra 11600 x g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Pellet üç defa lysis buffer ile yıkandıktan sonra, üzerine 250 µl PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCL (pH 8), %0,1Triton X-100, pH 8,3) ve 50 µg proteinaz K/ml ilave edilerek, 56 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Son olarak örnekler, 95 °C'de 10 dk. kaynatılmış ve elde edilen genomik DNA'lar PZR işleminde template olarak kullanılıncaya kadar – 20 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.3.3.2. Kontrol DNA örnekleri

Pozitif kontrol DNA örneği olarak, *T. ovis* (EF092452), *B. ovis* (EF092454), *Theileria* sp. MK (EU262483) ve *Theileria* sp. OT3 (EF092455) için daha önce laboratuvarımızda izole edilen ve stoklarımızda mevcut genomik DNA'lar kullanılmıştır. *T. lestoquardi* pozitif DNA örneği ise Dr. Jabbar Ahmed (Immunology and Cell Biology, Research Center, Borstel Germany)'den temin edilmiştir.

4.3.3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

PZR, Hybaid PCR Sprint Thermal Cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. Touch Down Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (Touch Down PZR) *Theileria* ve *Babesia* türlerinin 18S ssu rRNA geninin V4 değişken bölgesini çoğaltan (360-430 bp) RLB-F2 ve RLB-R2 primerleri (Tablo 4) kullanılmıştır (127). Amplifikasyonda kullanılan primerler, "The Midland Certified Reagent (Co. Inc. A.B.D.), Eurofins MWG Operon (Almanya) ve İontek (İstanbul)" firmalarına sentezlettirilmiştir. Liyofilize halde gönderilen primerler, DNaz ve RNaz içermeyen bi-distile steril su ile 100 pmol/μl konsantrasyonda sulandırılmıştır.

Toplam 25 μl hacimde hazırlanan PZR karışımına, 125 μM dNTP miks, 1,25 U Taq DNA polymerase enzimi, 5 mM MgCl, 1X PCR Buffer [750 mM Tris-HCl (pH 8,8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, %0,1 Tween 20], RLB-F2, RLB-R2 primerlerinden 2,5 μl (20 pmol/μl) ve hedef DNA'dan (template) 2,5 μl ilave edilmiştir. PZR şartları Tablo 5, reaksiyon içeriği ise Tablo 6'da verilmiştir. Her PZR reaksiyonunda pozitif ve negatif kontrol kullanılmıştır.

Tablo 4: Çalışmada kullanılan primer dizilimleri

Primer	Sekans (5'-3')	Konsantrasyon pmol / μ l	Kaynak
RLB-F2	GACACAGGGAGGTAGTGACAAG	20	127
RLB-R2	Biotin-CTAAGAATTTTCACCTCTGACAGT	20	127

Tablo 5: Çalışmada kullanılan Touch Down PZR ısı şartları

İşlem	Isı (C ⁰) – Süre (sn)	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94 – 20	2
Hibridizasyon	67 – 30	
Annealing	72 – 30	
Denatürasyon	94 – 20	2
Hibridizasyon	65 – 30	
Annealing	72 – 30	
Denatürasyon	94 – 20	2
Hibridizasyon	63 – 30	
Annealing	72 – 30	
Denatürasyon	94 – 30	2
Hibridizasyon	61 – 45	
Annealing	72 – 45	
Denatürasyon	94 – 45	2
Hibridizasyon	59 – 45	
Annealing	72 – 45	
Denatürasyon	94 – 45	40
Hibridizasyon	57 – 45	
Annealing	72 – 45	
Son uzatma	72 – 10 dk.	1
Bekletme	+4 C ⁰ 'de	

Tablo 6: Touch Down PZR reaksiyonu içeriği

Madde	Miktar (μ l)	Konsantrasyon
Steril distile su	13	1,25 mM
PCR Buffer	2,5	
MgCl	2,5	
dNTP	2	
Taq DNA polimeraz	0,1	20 pmol/ μ l
Revers primer	1,25	
Forward primer	1,25	
Template DNA	2,5	

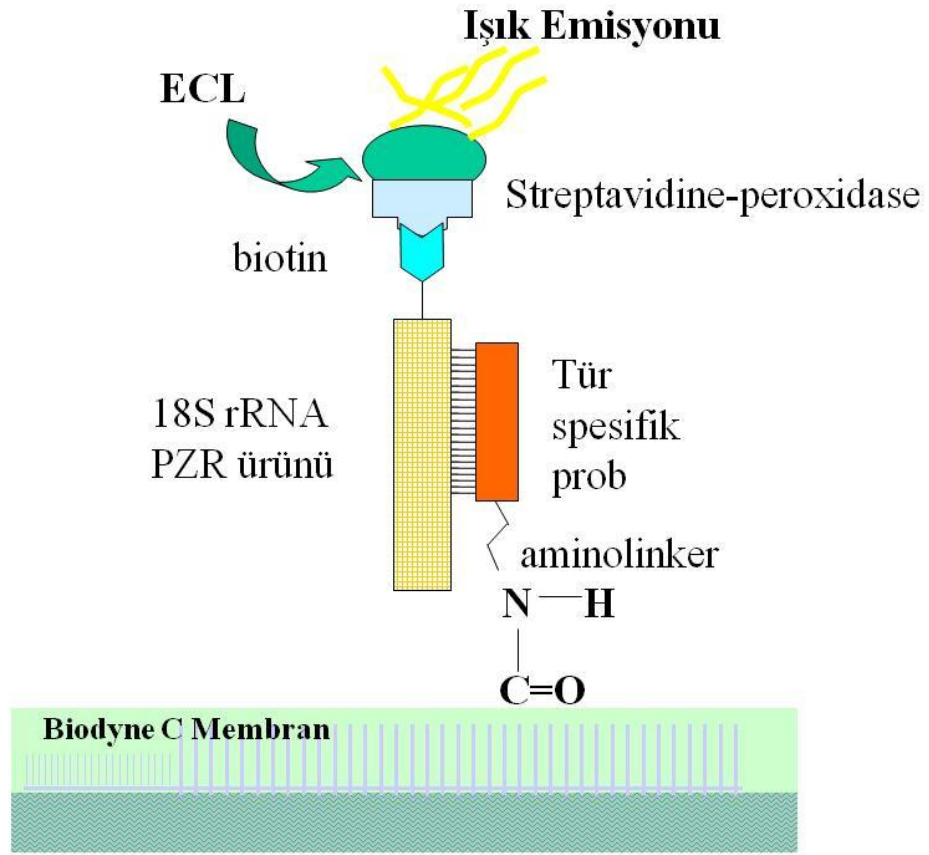
final konsantrasyon: 25 μ l

4.3.3.4. Agaroz jel elektroforezi

PZR sonucu elde edilen ürünlerin bir kısmı, 5 µl yükleme solüsyonu (Loading Dye) ile karıştırılarak jeldeki (%1,6'lık agaroz jel) kuyucuklara yüklenmiş ve 90 voltluk akımda 1 saat süreyle yürütülmüştür. Daha sonra jel, ethidium bromide (10mg/ml) ile 30 dk. boyandıktan sonra, UV (Ultraviole) transillüminatörde spesifik bantların varlığı yönünden incelenmiştir. Bantların moleküler ağırlığını saptamak için 100 bç'lik marker kullanılmıştır. PZR ürünlerinin jel elektroforezi sonucunda, 360-430 bç'lik bantlar *Theileria* ve *Babesia* türleri yönünden pozitif olarak kabul edilmiştir.

4.3.3.5. Revers line blotting (RLB)

RLB testi ilgili literatürlerde belirtildiği şekilde yapılmıştır (63, 114, 127, 128). RLB testinin prensibi Şekil 3'de (129) verilmiştir.



Şekil 3: RLB'nin çalışma prensibi (129)

RLB'de kullanılan problemlerin nükleotid dizileri ve konsantrasyonları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7: Çalışmada kullanılan prob dizimleri

Prob	Sekans	pmol / 150 µl*	Kaynak
Catchall	TAATGGTTAATAGGA(AG)C(AG)GTTG	200	114
<i>Theileria</i> spp.	TGATGGGAATTTAAACC(CT)CTTCCA	200	62
<i>T. ovis</i>	TTTTGCTCCTTTACGAGTCTTTGC	400	62
<i>T. lestoquardi</i>	ATTGCTTGTGTCCCTCCG	400	36
<i>T. uilenbergi</i>	TGCATTTTCCGAGTGTTACT	400	36
<i>T. luwenshuni</i>	TCGGATGATACTTGTATTATC	400	36
<i>Theileria</i> sp. OT1	ATCTTCTTTTTGATGAGTTGGTGT	400	62
<i>Theileria</i> sp. OT3	ATTTTCTCTTTTATATGAGTTTT	400	62
<i>Theileria</i> sp. MK	CATTGTTTCTTCTCATGTC	400	62
<i>Babesia</i> spp.	CCT(GT)GGTAATGGTTAATAGGAA	200	36
<i>B. ovis</i>	GCGCGCGGCCTTTGCGTTTACT	400	62
<i>B. motasi</i>	ATTGGAGTATTGCGCTTGCTTTTT	400	62
<i>B. crassa</i>	TTATGGCCCGTTGGCTTAT	400	36

* Prob konsantrasyonları bu çalışmada standardize edilmiştir.

4.3.3.5.1. RLB membranının hazırlanması

RLB testinde kullanılacak türe özgü problemler 5' – uçlarında amino grubu N – (Trifluoracetamidohexyl – etanoethyl, N, N, - diisopropyl phosphoramidite (TFA)-C6 aminolinker) içerecek şekilde “The Midland Certified Reagent (Co. Inc. A.B.D.) firmasına sentezletirilmiştir. Liyofilize halde gönderilen problemler, DNaz ve RNaz içermeyen bi-distile steril su ile 100 pmol/µl konsantrasyonda sulandırılmıştır. Biotin C membran (PALL Gelman Laboratory, A.B.D.) oda ısısında 10 dakika, 10 ml %16 EDAC [1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide], (Sigma, A.B.D.)) ile aktive edildikten sonra, demineralize su ile yıkanmış ve MN45 Miniblotter’a (Isogen Life Sciences, Hollanda) yerleştirilmiştir. Membran, üzerindeki kalıntı sıvı aspire edildikten sonra, 500 mM NaHCO₃ (pH: 8,4) ile uygun konsantrasyonlarda (50-1200 pmol/150µl) sulandırılan problemlerden 150 µl alınarak ilk ve son kanal hariç tüm kanallara dökülmüştür. Membranın ilk ve son kanallarına ise 2XSSPE %0,5 SDS ile 1/100 oranında sulandırılmış çini mürekkebi dökülmüş ve oda ısısında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kanallardaki sıvılar aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Membran, Miniblotterdan çıkarılmış ve oda ısısında 10 dk. 100 mM NaOH içinde inkübe edilerek inaktif hale getirilmiştir. İnaktivasyondan sonra membran, 2X SSPE/ %0,1 SDS içinde 60 °C’de 5 dakika yıkanarak kullanılır duruma getirilmiştir.

4.3.3.5.2. Reverse line blotting

PZR ürünlerinden 20 µl alınarak, 2X SSPE / %0,1 SDS ile 150 µl'ye tamamlanmış ve Thermal Cycler cihazında 99 °C' de 10 dakika tutularak denatüre edilmiştir. Denatürasyon işleminden sonra, DNA iplikçiklerinin tekrar birleşmemesi için PZR ürünleri buz üzerinde şok soğutulmuştur. 20 mM EDTA içerisinde +4 °C'de muhafaza edilen membran, 2X SSPE / %0,15 SDS ile oda ısısında 5 dk. yıkanmıştır. Prob sıraları ile Miniblotter kanalları 90° açı yapacak şekilde Miniblotter'a yerleştirilen membran, üzerindeki fazla sıvı aspire edilip uzaklaştırıldıktan sonra PZR ürünleri Miniblotter kanallarına dökülmüş ve düz bir zeminde 42 °C' de 1 saat inkübe edilerek hibridizasyon sağlanmıştır. Hibridizasyon işleminden sonra, kanallardaki sıvı aspire edilmiş ve membran Miniblotter'dan çıkarılarak, 2X SSPE / %0,5 SDS solüsyonu ile 2 defa 52 °C'de 10 dakika yıkanmıştır. Membran 42 °C'de 30 dakika 2X SSPE/ %0,5 SDS ile 1:4000 oranında sulandırılmış 10 ml Peroksidaz ile işaretlenmiş streptavidin-POD Konjugat (Roche, Almanya) solüsyonunda hafif çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben membran, 2X SSPE / %0,5 SDS ile 2 defa 42 °C'de 10 dakika ve 2X SSPE ile 2 defa oda ısısında 5 dakika yıkanmıştır. Membran 10 ml ECL sıvısında (Amersham, İngiltere) 1 dakika inkübe edildikten sonra, sert bir zemine alınarak, üzeri asetatla örtülmüş ve hava kabarcıkları uzaklaştırıldıktan sonra, karanlık ortamda Kodak Biomax Light Film (A.B.D.) altında, sinyallerin kuvvetine göre 30 sn -30 dk. bekletilmiş ve banyo işlemine geçilmiştir.

Değerlendirmede, filmler üzerinde prob ve PZR ürünlerinin döküldüğü sıraların kesiştiği kısımlarda meydana gelen siyah lekeler pozitif olarak kabul edilmiştir.

4.4. Çalışmada kullanılan solüsyonlar

4.4.1. Mikroskopide kullanılan solüsyonlar

Metanol (Merck, Germany)

Giemsa stok solüsyonu (Merck, Germany)

%5'lik Giemsa solüsyonu

Giemsa stok solüsyonu distile suda %5 oranında sulandırıldı.

İmmersiyon yağı

4.4.2. DNA ekstraksiyonu için gerekli solüsyonlar

Lysis Buffer (pH 7,5)

0,32 M sucrose (katı) (ADR)

0,01 M Tris (katı) (Sigma, St. Louis, MO, US)

0,005 M MgCL₂ (katı) (Sigma, St. Louis, MO, US)

%1 Triton X-100 (Sıvı) (Sigma, St. Louis, MO, US)

Hazırlanışı: (250 ml distile su için)

27,38 gr sucrose, 0,303 gr tris, 0,253 gr $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve 2,5 ml Triton X Ben Mari'de çözdürülür.

PCR Buffer (pH 8,3)

50 mM KCl (katı) (Sigma, St. Louis, MO, US)

10 mM Tris-HCL (sıvı) (pH 8) (1 M, Sigma, St. Louis, MO, US)

%0,1 Triton X-100

Hazırlanışı: (50ml distile su için)

0,5 ml Tris HCl, 0,19 gr KCl, 0,05 ml: 50 μl Triton X ben mari'de çözdürülür. Kullanılacağı zaman 1 ml buffer için 2 μl (25 mg/ml) proteinaz-K ilave edilir.

Proteinase K Solüsyonu (100 mg, Sigma, St. Louis, MO, US)

1 ml'sinde 100 μg olacak şekilde hazırlandı.

4.4.3. PZR için gerekli solüsyonlar

10 X PCR Buffer (MBI Fermentas, Lithuania)

750 mM Tris-HCl (pH 8,8; 25 °C)

200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

%0,1 Tween 20

Her PZR numunesi için 5 µl kullanıldı.

MgCl₂ (25 mM; Sigma, St. Louis, MO, US)

Her PZR numunesi için 5 µl kullanıldı.

dNTP Set (100 mM'lık miks; dATP + dTTP + dCTP + dGTP; MBI

Fermentas, Lithuania)

Steril distile su kullanılarak 1,25 mM yoğunlukta hazırlandı.

Taq DNA Polymerase Enzimi (500 U; MBI Fermentas, Lithuania)

Her PZR numunesi için 1,25 U (0,25 µl) kullanıldı.

Primerler (The Midland Certified Reagent Co. Inc. USA)

Primerlerin sentezi The Midland Certified Reagent (Co. Inc. A.B.D.), MWG (Almanya) ve İontek (İstanbul) " firmalarınca yapılmış ve liyofilize halde teslim alınmıştır. Primerler firmanın önerdiği miktarlarda bi-distile DNaz ve RNaz içermeyen steril su kullanılarak, 100 pmol/µl konsantrasyonda olacak şekilde sulandırılmıştır.

4.4.4. Agaroz jel elektroforezi için gerekli solüsyonlar

5X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu

Tris 54,4 g

Borik Asit 27,2 g

EDTA 4,6 g

Yukarıdaki maddeler tartılıp distile su ile 1 lt'ye tamamlandı. pH 8,3'e ayarlandı. Elektroforez solüsyonu olarak 1 X oranında sulandırılarak kullanıldı.

Agarose LE (Promega, Madison, US)

1,6 gr Agorose LE'ye 100 ml 1X TBE solüsyonuna ilave edildi ve Mikrodalga fırında kaynatıldı

DNA ladder (50µg/100 µl; MBI Fermentas, Lithuania)

1/6 oranında sulandırıldı ve 5 µl kullanıldı.

Loading Dye Solüsyonu (6X; MBI Fermentas, Lithuania)

1/6 oranında sulandırıldı 1 birim PZR ürünü için 1 birim 1X Loading Dye kullanıldı.

Ethidium Bromide (AppliChem GmbH, Dramstadt, Germany)

10mg/µl olacak şekilde sulandırıldı. Agorase jeli boyama için 250 ml distile suya 10 µl Ethidium Bromide solüsyonu katıldı.

4.4.5. Revers line blotting için gerekli solüsyonlar

500 mM NaHCO₃ (pH 8,4)

21,0025 gr NaHCO₃ 500 ml distile suda çözündürülür.

Oda ısısında 1 yıl saklanabilir.

%16'lık EDAC [(1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) (Sigma, USA)] (taze hazırlanır)

1,6 gr EDAC 10 ml steril distile suda çözündürülür.

20X SSPE (stok)

175,3 gr NaCl

27,6 gr NaH₂PO₄ – H₂O(sodium phosphate monobasic)

7,4 gr EDTA

800 ml distile su

10 M NaOH ile pH 7,4'e ayarlanır ve 20 dk. otoklavlanır.

2X SSPE (taze hazırlanır)

20X SSPE 10 katı sulandırılır.

100 mM NaOH (taze hazırlanır)

0.4 gr NaOH 100 ml distile suda çözündürülür.

%10'luk SDS (oda ısısında 1 ay muhafaza edilir)

100 gr. SDS 1 lt. 'ye distile su ile tamamlanır ve 65 °C'de 20 dk.'da hazırlanır.

2X SSPE / %0,1 SDS (taze hazırlanır)

100 ml 20X SSPE ve 10 ml %10'luk SDS, 890 ml distile suda çözündürülür.

2X SSPE / %0,15 SDS (taze hazırlanır)

100 ml 20X SSPE ve 15 ml %10'luk SDS, 885 ml distile suda çözdürülür.

2X SSPE / %0,5 SDS (taze hazırlanır)

100 ml 20X SSPE ve 50 ml %10'luk SDS, 850 ml distile suda çözdürülür.

Streptavidine POD conjugate (taze hazırlanır)

0,125 U/μl olarak hazırlandı ve her RLB için 20 μl (2,5 U) kullanılmıştır.

10 ml 2X SSPE / %0,5 SDS solüsyonuna 2,5 U konjugat ilave edilir (1/4000 oranında sulandırılır).

%1'lik SDS (taze hazırlanır)

%10'luk stoktan 10 katı sulandırılır.

0,1 M EDTA (stok)

37,224 gr EDTA 1 litre distile suda çözdürülür.

20 mM EDTA

0,1 M'lık stoktan 5 kat sulandırılarak hazırlanır.

4.5. İstatistiksel analiz

Mikroskobi, PZR ve RLB sonuçlarının karşılaştırılması, illerdeki pozitiflik oranlarının değerlendirilmesi, *Theileria* ve *Babesia* türlerinin iller ve konakları bazında görülme sıklığının değerlendirilmesi Pearson Chi-Square (χ^2) testi ile yapıldı. $P < 0,05$ bulunan değerler istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Bu testlerin yapılmasında SPSS 15.00 paket programı kullanıldı.

5. BULGULAR

5.1. Mikroskopik muayene sonuçları

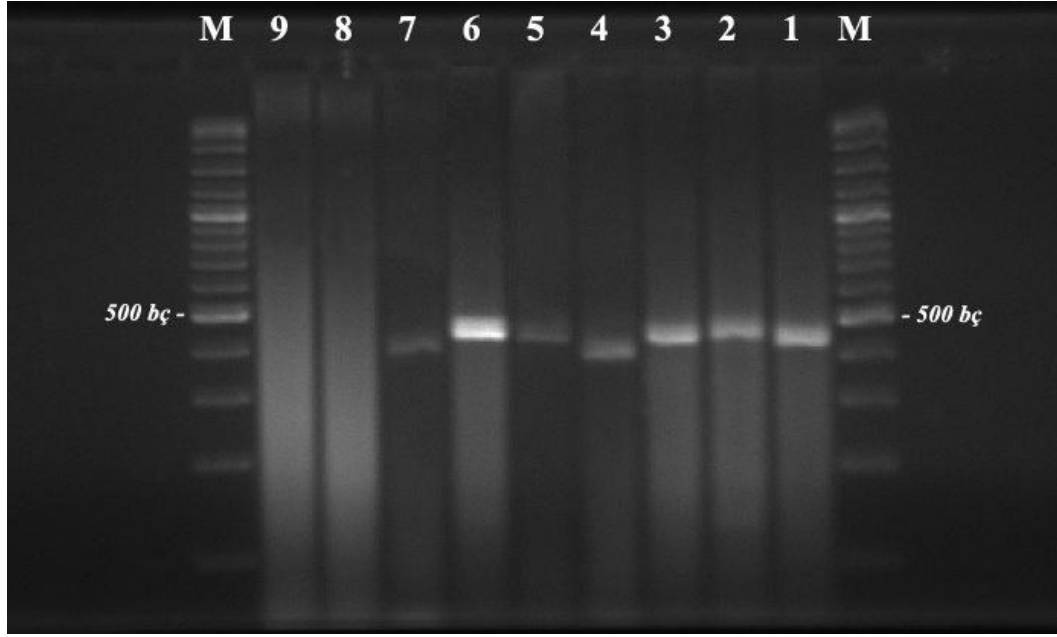
Karadeniz bölgesinde *Theileria* spp. ve *Babesia* spp. yönünden incelenen koyun ve keçilerin mikroskopik bakı sonuçları Tablo 8 ve 10'da verilmiştir.

Tablodan izlenebileceği gibi 34 koyun (%3,91) ve 4 keçi (%1,54) olmak üzere toplam 38 (%3,37) hayvanda *Theileria* spp. piroplasm formları tespit edilmiştir. Hayvanlarda *Babesia* spp. piroplasmalarına rastlanmamıştır. Pozitiflik oranı en fazla Çorum'da (%6,06) en az ise Bayburt'ta (%0,64) tespit edilmiştir. Mikroskopi sonuçlarına göre *Theileria* spp. görülme oranları koyun ve keçiler arasında istatistiksel olarak önemli bulunmamış (P değeri: 0,064, χ^2 : 3,437), buna karşın *Theileria* spp. pozitif örneklerin illere göre dağılımı karşılaştırıldığında, ortaya çıkan farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P değeri: 0,016, χ^2 : 15,623).

5.2. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları

Tüm *Theileria* ve *Babesia* türlerini çoğaltan primerlerle (RLB-R2-Biotin, RLB-F2) yapılan PZR sonuçları Tablo 8 ve 10'da, PZR'de elde edilen ürünlerin agarose jel elektroforez sonrası görünümü Şekil 4'de verilmiştir. Buna göre 1128 örneğin 201 tanesinde (%17,82) pozitiflik saptanmıştır. İncelenen 869 koyunun 185'inin (%21,29), 259 keçinin 16'sının (%6,18) *Theileria* ya da *Babesia* türleri ile enfekte oldukları belirlenmiştir. Pozitiflik oranı en fazla Çorum'da (%32,73) en az ise Bayburt'ta (%3,21) tespit edilmiştir. PZR sonuçlarına göre koyun ve

keçilerde pozitiflik oranları (P değeri: 0,0001, χ^2 : 31,114) ve illere göre pozitiflik oranları arasındaki farklar (P değeri: 0,0001, χ^2 : 77,646) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.



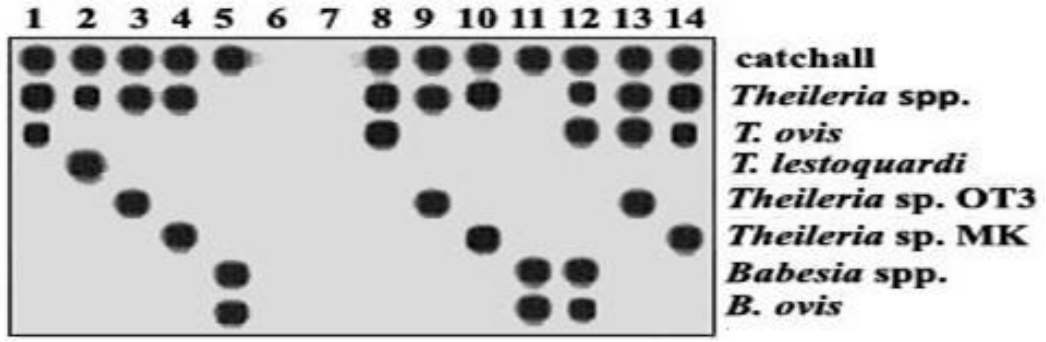
Şekil 4: *Theileria* ve *Babesia* soy spesifik RLB-R2-Biotin, RLB-F2 primerleri ile yapılan PZR’de elde edilen ürünlerin etidium bromide ile boyalı agarose jeldeki görünümü. M: marker (100 bç’lik), 1. *T. ovis*, 2. *Theileria* sp. OT3, 3. *Theileria* sp. MK, 4. *B. ovis*, 5. *T. ovis* + *B. ovis* (miks örnek), 6. *T. ovis* pozitif kontrol, 7. *B. ovis* pozitif kontrol, 8. PZR negatif kontrol (distile su) 9. Ekstraksiyon negatif kontrol (*Theileria* ve *Babesia* ile enfekte olmayan koyun gDNA’sı)

5.3. Revers line blotting sonuçları

RLB sonuçları Tablo 8, 9, 10’da, *Theileria* ve *Babesia* tür / genotiplerine ait Revers line blotting görüntüsü Şekil 5’de verilmiştir. Tablolardan da izlenebileceği gibi RLB ile muayene edilen 1128 küçük ruminantın 362 tanesi (%32,09) [334 koyun (%38,43), 28 keçi (%10,81)]

tek veya miks enfeksiyonlar şeklinde pozitif bulunmuştur. Bölgedeki koyun ve keçilerin *T. ovis*, *Theileria* sp. OT3, *Theileria* sp. MK ve *B. ovis* ile enfekte oldukları belirlenmiştir. Bunlardan *T. ovis* 327 (%28,99), *Theileria* sp. OT3 23 (%2,04), *Theileria* sp. MK 7 (%0,62), *B. ovis* ise 5 (%0,44) hayvanda tespit edilmiştir (Tablo 13). Miks enfeksiyonlar *T. ovis* + *B. ovis*, *T. ovis* + *Theileria* sp. OT3 ve *T. ovis* + *Theileria* sp. MK olmak üzere toplam 15 hayvanda belirlenmiştir. RLB sonuçlarına göre en fazla enfeksiyon oranı %63,03 ile Çorum'da, en az oran ise %5,13 ile Bayburt'ta belirlenmiştir.

İncelenen koyunlardan 288'i (%33,14) *T. ovis*, 16'sı (%1,84) *Theileria* sp. OT3, 2'si (%0,23) *Theileria* sp. MK, 2'si (%0,23) *B. ovis*, 3'ü (%0,35) *T. ovis* + *B. ovis*, 7'si (%0,81) *T. ovis* + *Theileria* sp. OT3 ve 3'ü (%0,35) *T. ovis* + *Theileria* sp. MK ile enfekte bulunmuştur. Keçilerin ise 24'ü (%9,27) *T. ovis* ve 2'si (%0,77) *T. ovis* + *Theileria* sp. MK ile enfekte olduğu ortaya konmuştur. Sonuç olarak bölgede *T. ovis*'in moleküler prevalansı koyunlarda %34,64 (301/869), keçilerde %10,04 (26/259) olarak belirlenmiştir. *B. ovis*'in moleküler prevalansı koyunlarda %0,58 (5/869), keçilerde %0 (0/259), *Theileria* sp. OT3'ün moleküler prevalansı koyunlarda %2,65 (23/869), keçilerde %0 (0/259), *Theileria* sp. MK'nın moleküler prevalansı koyunlarda %0,58 (5/869), keçilerde %0,77 (2/259) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 5: *Theileria* ve *Babesia* tür / genotipleri ile enfekte koyun ve keçilere ait genomik DNA'ların ve negatif kontrollerin template olarak kullanılarak amplifikasyonu sonucu yapılan Revers Line Blotting görüntüsü. Oligonükleotit proplar satırlarda, örnekler ise sütünlarda gösterilmiştir. Pozitif ve negatif kontroller, tek veya miks enfeksiyonlar sırayla gösterilmiştir.

1: *T. ovis* (Pozitif Kontrol); 2: *T. lestoquardi* (Pozitif Kontrol); 3: *Theileria* sp. OT3 (Pozitif Kontrol); 4: *Theileria* sp. MK (Pozitif Kontrol); 5: *B. ovis* (Pozitif Kontrol); 6: Negatif Kontrol (Enfekte Olmayan Koyunun genomik DNA'sı); 7: Negatif PZR Kontrol (Distile Su); 8: *T. ovis* (Saha Örneği); 9: *Theileria* sp. OT3 (Saha Örneği); 10: *Theileria* sp. MK (Saha Örneği); 11: *B. ovis* (Saha Örneği); 12: *T. ovis* ve *B. ovis* ile miks (Saha Örneği); 13: *T. ovis* ve *Theileria* sp. OT3 ile miks (Saha Örneği); 14: *T. ovis* ve *Theileria* sp. MK ile miks (Saha Örneği)

Tablo 8: Karadeniz bölgesinde mikroskopi, PZR ve RLB ile saptanan *Theileria* ve *Babesia* türlerinin illerde koyun ve keçilere göre dağılımı

Toplanan Örneklerle Ait Bilgiler			Mikroskopi Sonucu		PZR Sonucu	RLB Sonucu										
İl	Konak	Örnek Sayısı	<i>Theileria</i> spp.	<i>Babesia</i> spp.	Pozitif	Toplam Enfeksiyon Sayısı				Tek Enfeksiyon Sayısı				Mix Enfeksiyon Sayısı		
						<i>T. ovis</i>	<i>Theileria</i> sp. OT3	<i>Theileria</i> sp. MK	<i>B. ovis</i>	<i>T. ovis</i>	<i>Theileria</i> sp. OT3	<i>Theileria</i> sp. MK	<i>B. ovis</i>	<i>T. ovis</i> + <i>B. ovis</i>	<i>T. ovis</i> + <i>Theileria</i> sp. OT3	<i>T. ovis</i> + <i>Theileria</i> sp. MK
Bolu	Koyun	123	9	-	46	66	6	1	-	63	4	-	-	-	2	1
	Keçi	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Σ	163	9	-	46	66	6	1	-	63	4	-	-	-	2	1
Kastamonu	Koyun	125	3	-	22	35	3	-	2	33	2	-	1	1	1	-
	Keçi	38	-	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	Σ	163	3	-	23	36	3	-	2	34	2	-	1	1	1	-
Çorum	Koyun	125	10	-	54	101	3	-	-	99	1	-	-	-	2	-
	Keçi	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Σ	165	10	-	54	101	3	-	-	99	1	-	-	-	-	-
Samsun	Koyun	123	7	-	33	51	1	3	1	48	-	2	-	1	1	1
	Keçi	35	2	-	3	6	-	1	-	5	-	-	-	-	-	1
	Σ	158	9	-	36	57	1	4	1	53	-	2	-	1	1	2
Tokat	Koyun	123	2	-	20	30	7	1	2	27	6	-	1	1	1	1
	Keçi	39	1	-	6	8	-	1	-	7	-	-	-	-	-	1
	Σ	162	3	-	26	38	7	2	2	34	6	-	1	1	1	2
Giresun	Koyun	129	2	-	6	14	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-
	Keçi	32	1	-	5	10	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-
	Σ	161	3	-	11	24	-	-	-	24	-	-	-	-	-	-
Bayburt	Koyun	121	1	-	4	4	3	-	-	4	3	-	-	-	-	-
	Keçi	35	-	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	Σ	156	1	-	5	5	3	-	-	5	3	-	-	-	-	-
Toplam	Koyun	869	34	-	185	301	23	5	5	288	16	2	2	3	7	3
	Keçi	259	4	-	16	26	-	2	-	24	-	-	-	-	-	2
	Σ	1128	38	-	201	327	23	7	5	312	16	2	2	3	7	5

Tablo 9: RLB ile koyun ve keçilerde belirlenen *Theileria* ve *Babesia* türlerinin prevalansı

Pozitiflik	Parazit Türü			
	<i>T.ovis</i>	<i>Theileria</i> sp. OT3	<i>Theileria</i> sp. MK	<i>B. ovis</i>
327	+			
23		+		
7			+	
5				+
362 (%32,09)	327 (%28,99)	23 (%2,04)	7 (%0,62)	5 (%0,44)

Tablo 10: Mikroskopik bakı, PZR ve RLB sonuçlarının odaklara dağılımı

İller	n	Test					
		Mikroskopik bakı		PZR		RLB	
		+	%	+	%	+	%
Bolu	163	9	5,52	46	28,22	73	44,79
Kastamonu	163	3	1,84	23	14,11	41	25,15
Çorum	165	10	6,06	54	32,73	104	63,03
Samsun	158	9	5,70	36	22,78	63	39,87
Tokat	162	3	1,85	26	16,05	49	30,25
Giresun	161	3	1,86	11	6,83	24	14,91
Bayburt	156	1	0,64	5	3,21	8	5,13
Toplam	1128	38	3,37	201	17,82	362	32,09

Pozitif örnekleri belirlemedeki RLB, PZR ve mikroskopi yöntemleri arasındaki farklılıklar, RLB sonuçlarına göre illerdeki pozitiflik oranları, *Theileria* ve *Babesia* türlerinin ve koyun ve keçilerdeki *Theileria* ve

Babesia enfeksiyonlarının görülme sıklığı arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 11, 12, 13, 14).

Tablo 11: Mikroskopi, PZR ve RLB sonuçlarının Pearson Chi-Square testi ile karşılaştırılması

	Test			n	P değeri
	Mikroskopi (+, %)	PZR (+, %)	RLB (+, %)		
Pozitiflik	38/1128 (3,37)	201/1128 (17,82)	362/1128 (32,09)	1128	0,0001 χ^2 :318,588

Tablo 12: RLB ile belirlenen pozitiflik oranlarının illere göre Pearson Chi-Square testi ile karşılaştırılması

İller	Pozitiflik (+, %)
Bolu	73/163 (44,79)
Kastamonu	41/163 (25,15)
Çorum	104/165 (63,03)
Samsun	63/158 (39,87)
Tokat	49/162 (30,25)
Giresun	24/161 (14,91)
Bayburt	8/156 (5,13)
Toplam	362/1128 (32,09)
P Değeri	0,0001
χ^2	166,626

Tablo 13: Karadeniz bölgesinde tespit edilen *Theileria* ve *Babesia* türlerinin görülme sıklığının Pearson Chi-Square testi ile karşılaştırılması

	Parazit Türü				P değeri
	<i>T. ovis</i> (+, %)	<i>Theileria</i> sp. OT3 (+, %)	<i>Theileria</i> sp. MK (+, %)	<i>B. ovis</i> (+, %)	
Pozitiflik	327/1128 (%28,99)	23/1128 (%2,04)	7/1128 (%0,62)	5/1128 (%0,44)	0,0001 χ^2 :898,267

Tablo 14: Karadeniz bölgesinde *Theileria* ve *Babesia* enfeksiyonlarının koyun ve keçilerde görülme sıklığının Pearson Chi-Square testi ile karşılaştırılması

	Tür		P değeri
	Koyun	Keçi	
Pozitiflik	334/869 (%38,43)	28/259 (%10,81)	0,0001 χ^2 :69,867

5.4. Kene identifikasyon sonuçları

Çalışmanın yürütüldüğü illerde koyun ve keçilerde görülen kene enfestasyon oranlarına ilişkin veriler Tablo 15'de gösterilmiştir. Tabloya göre muayene edilen 2608 küçükbaş hayvanın (2161 koyun, 447 keçi) 812 tanesi (665 koyun, 147 keçi) kene ile enfeste bulunmuş, koyunlardan 2263 ve keçilerden 534 olmak üzere 2797 adet kene toplanmıştır. Bölgedeki küçükbaş hayvanların kene ile enfestasyon oranı %31,13 olarak tespit edilmiş, bu oran koyunlarda %30,77, keçilerde ise %32,89 olarak belirlenmiştir. İllerdeki enfestasyon oranının %20,65 ile %41,18 arasında değiştiği, Kastamonu'da en düşük (%20,65), Samsun'da ise en yüksek (%41,18) düzeyde olduğu saptanmıştır.

Tespit edilen kene türlerinin görülme oranı ve il bazındaki dağılımları Tablo 16'da sunulmuştur. Buna göre hayvanlar üzerinden 2797 adet erişkin kene toplanmış. Bu kenelerin *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Ixodes* ve *Hyalomma* soylarına ait ve *R. turanicus* (%28,64), *H. parva* (%22,60), *R. bursa* (%18,27), *D. marginatus* (%16,55), *R. sanguineus* (%3,32), *I. ricinus* (%2,47), *H. punctata* (%2,36), *H. marginatum* (%2,22), *H. sulcata* (%1,39), *H. excavatum* (%1,18), *H. concinna* (%0,54) ve *H. detritum* (%0,46) olmak üzere 12 farklı türden oluştuğu görülmüştür.

Tablo 15: Çalışmanın yürütüldüğü illere göre muayene edilen ve kene tespit edilen koyun ve keçi sayıları ile toplanan kene sayıları ve enfestasyon oranları

İl	Muayene edilen hayvan sayısı			Kene tespit edilen hayvan sayısı			Tespit edilen kene sayısı			Kene Enfestasyon oranı (%)		
	Koyun	Keçi	Toplam	Koyun	Keçi	Toplam	Koyun	Keçi	Toplam	Koyun	Keçi	Toplam
Bayburt	257	40	297	78	2	80	239	10	249	30,35	5,00	26,94
Bolu	308	97	405	80	45	125	277	153	430	25,97	46,39	30,86
Çorum	325	64	389	144	15	159	571	61	632	44,31	23,44	40,87
Giresun	280	56	336	70	25	95	213	84	297	25,00	44,64	28,27
Kastamonu	334	63	397	73	9	82	208	14	222	21,86	14,29	20,65
Samsun	323	66	391	124	37	161	503	144	647	38,39	56,06	41,18
Tokat	334	61	395	96	14	110	252	68	320	28,74	22,95	27,85
Toplam	2161	447	2608	665	147	812	2263	534	2797	30,77	32,89	31,13

Tablo 16: Tespit edilen kene türlerinin illere göre dağılımı

İL KENE TÜRÜ	Bolu	Kastamonu	Çorum	Samsun	Tokat	Giresun	Bayburt	Toplam	%
<i>Rhipicephalus</i> spp.	95	100	451	368	181	210		1405	50,23
<i>Rhipicephalus bursa</i>	1	99	24	187	68	132		511	18,27
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			90	3				93	3,32
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	94	1	337	178	113	78		801	28,64
<i>Haemaphysalis</i> spp.	216	18	75	171	74	6	192	752	26,89
<i>Haemaphysalis parva</i>	153	6	73	156	54		190	632	22,60
<i>Haemaphysalis punctata</i>	45	9		7	4	1		66	2,36
<i>Haemaphysalis sulcata</i>	13	2		4	16	4		39	1,39
<i>Haemaphysalis concinna</i>	5	1	2	4		1	2	15	0,54
<i>Dermacentor</i> spp.	99	82	71	103	40	11	57	463	16,55
<i>Dermacentor marginatus</i>	99	82	71	103	40	11	57	463	16,55
<i>Ixodes</i> spp.	7	3		3		56		69	2,47
<i>Ixodes ricinus</i>	7	3		3		56		69	2,47
<i>Hyalomma</i> spp.	13	19	35	2	25	14		108	3,86
<i>Hyalomma excavatum</i>		2	25		5	1		33	1,18
<i>Hyalomma detritum</i>	3	1		1	8			13	0,46
<i>Hyalomma marginatum</i>	10	16	10	1	12	13		62	2,22
Toplam	430	222	632	647	320	297	249	2797	

Tablo 17’de bölgede tespit edilen kene türlerinin koyun ve keçilerdeki dağılımı verilmiştir. Buradan da izlenebileceği gibi *R. sanguineus* ve *H. excavatum* sadece koyunlarda diğer türler ise hem koyun ve hemde keçilerde bulunmuş, koyunlarda en yaygın türlerin sırasıyla *R. turanicus*, *H. parva* ve *D. marginatus*; keçilerde ise *R. bursa*, *R. turanicus* ve *H. parva* olduğu belirlenmiştir

Tablo 17: Tespit edilen kene türlerinin koyun ve keçilerdeki dağılımı

Kene Türü	Koyun	Keçi	Toplam
<i>Rhipicephalus</i> spp.	1063	342	1405
<i>Rhipicephalus bursa</i>	322	189	511
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	93		93
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	648	153	801
<i>Haemaphysalis</i> spp.	647	105	752
<i>Haemaphysalis parva</i>	561	71	632
<i>Haemaphysalis punctata</i>	43	23	66
<i>Haemaphysalis sulcata</i>	33	6	39
<i>Haemaphysalis concinna</i>	10	5	15
<i>Dermacentor</i> spp.	410	53	463
<i>Dermacentor marginatus</i>	410	53	463
<i>Ixodes</i> spp.	57	12	69
<i>Ixodes ricinus</i>	57	12	69
<i>Hyalomma</i> spp.	86	22	108
<i>Hyalomma excavatum</i>	33		33
<i>Hyalomma detritum</i>	12	1	13
<i>Hyalomma marginatum</i>	41	21	62
Toplam	2263	534	2797

Tespit edilen kene türlerinin mevsimsel dağılımları ile ilgili bilgiler Tablo 18’de verilmiştir. Buradan da izlenebileceği gibi *D. marginatus* sonbahar, kış ve ilkbahar aylarında daha fazla olmak üzere tüm

mevsimlerde, *H. concinna* kışın ve daha az olarak da yaz aylarında, *H. parva* yaz hariç bütün mevsimlerde, *H. punctata* ve *H. sulcata* çoğunlukla sonbahar, daha az olarak da kış ve ilkbaharda, *Hyalomma* türleri ilkbahar ve yaz aylarında, *I. ricinus* bütün mevsimlerde, *R. bursa* yazın, *R. sanguineus* ilkbahar ve *R. turanicus* çoğunlukla yaz ve ilkbahar daha az olarak da sonbaharda hayvanlar üzerinde bulunmuştur.

Tablo 18: Tespit edilen kene türlerinin mevsimlere göre dağılımı

Kene türü	Mevsimlere göre kene sayıları							
	Kış	İlkbahar		Yaz		Sonbahar		Toplam
	Ocak	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ekim	Kasım	
<i>Dermacentor marginatus</i>	96	75	39	34	3	68	148	463
<i>Haemaphysalis concinna</i>	13			1	1			15
<i>Haemaaphysalis parva</i>	176	92	19			79	266	632
<i>Haemaphysalis punctata</i>	6	6				43	11	66
<i>Haemaphysalis sulcata</i>	2	1	4			14	18	39
<i>Hyalomma excavatum</i>		18	13		2			33
<i>Hyalomma detritum</i>		2	5	3	3			13
<i>Hyalomma marginatum</i>		14	26	6	16			62
<i>Ixodes ricinus</i>	4	24	12	10		3	16	69
<i>Rhipicephalus bursa</i>				68	443			511
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		93						93
<i>Rhipicephalus turanicus</i>		9	198	202	389	3		801
Toplam	297	334	316	324	857	210	459	2797
	297	650		1181		669		

6. TARTIŞMA

Koyun ve keçilerde bugüne kadar *Theileria* soyuna bağlı *T. lestoquardi*, *T. ovis*, *T. separata*, *T. uilenbergi* ve *T. luwenshuni* ve *Babesia* soyuna bağlı *B. ovis*, *B. motasi*, *B. crassa*, *B. taylori* ve *B. foliata* türleri saptanmış, bu türlerden *T. lestoquardi*, *T. uilenbergi* ve *T. luwenshuni*'nin yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden klinik enfeksiyonlara (1, 34, 35, 37, 38, 40), *T. ovis* ve *T. separata*'nın ise subklinik enfeksiyonlara yol açtığı (39), *B. ovis*'in koyunlarda yüksek patojeniteye sahip olduğu (1), *B. motasi*'nin *B. ovis*'e göre daha az patojenite gösterdiği (1) ve farklı patojenitelerde iki alt türünün olabileceği (11) *B. crassa*'nın ise apatojen bir tür olduğu belirtilmiştir (12).

Theileria ve *Babesia* enfeksiyonlarına uygun kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde, hastalığa neden olan türlerin identifikasyonu ve özellikle popülasyon içinde portör hayvanların insidensinin saptanması gereklidir.

Theileriosis ve babesiosis, akut vakalarda klinik bulgular ve kan ve lenf yumrusu frotilerinin mikroskopik muayenesiyle (100, 101), subklinik enfeksiyonlarda ise serolojik (53, 92, 94, 96, 103-107) ve moleküler test yöntemleri ile teşhis edilmektedir (62, 111, 117).

Theileria ve *Babesia* enfeksiyonlarını atlatan hayvanlarda etkenler çok az miktarlarda da olsa uzun süre eritrositler içerisinde kalırlar (130). Bu hayvanlar taşıyıcı (portör) konumunda olup, keneler için enfeksiyon kaynağını oluştururlar. Portör hayvanların popülasyon içindeki oranı, hastalığın epidemiyolojisi açısından önemlidir (102). Subklinik

enfeksiyonlarda enfekte eritrosit oranı çok düşük ve türlerin piroplasm formları benzer olduğundan, mikroskopik muayene yöntemi kullanılarak enfeksiyonun teşhisi ve özellikle birden fazla tür tarafından oluşturulan miks enfeksiyonların tür identifikasyonu çok zordur (130, 131). Serolojik testlerde türler arasında çapraz reaksiyonların görülebilmesi, spesifik immun yanıtların zayıf olabilmesi ve uzun süreli portörlük durumunda antikorların her zaman tespit edilememesi gibi sebeplerden dolayı hatalı teşhislerin konması söz konusu olabilmektedir (108-110).

Bu sebeplerden dolayı *Theileria* ve *Babesia* enfeksiyonlarının epidemiyolojilerine yönelik araştırmalarda mikroskopik ve serolojik yöntemlere alternatif olarak yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip moleküler tanı yöntemleri tercih edilmeye başlanmıştır. PZR'ın *Theileria* ve *Babesia* türlerinin ayrımı ve subklinik enfeksiyonların teşhisinde güvenli bir yöntem olduğu bildirilmiştir (113, 119, 132, 133). Klasik PZR metodu kullanılarak, özellikle taşıyıcı hayvanlarda *Theileria* ve *Babesia* türlerinin duyarlı ve özgül biçimde teşhisi sağlanmıştır. Her tür için ayrı yapılması gerekli olan tür spesifik PZR'ın zaman ve ekonomik kayba yol açması sebebi ile her seferde eş zamanlı olarak birden fazla türün (2-3 tür) belirlenmesini sağlayan multiplex PZR ve son yıllarda PZR ve hibridizasyonun birlikte kullanıldığı RLB metodu geliştirilmiştir. RLB ile bir defada çok sayıda parazit teşhis edilebilmekte ve bu yöntem *Theileria* ve *Babesia* türlerinin teşhisinde de başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (62, 63, 115-117, 121, 134).

Bu çalışmada, mikroskopik bakı, PZR ve RLB yöntemleri kullanarak, Karadeniz bölgesinde koyun ve keçilerde bulunan *Babesia* ve *Theileria* enfeksiyonlarının varlığı ve yayılışı araştırılmıştır. Bu amaçla bölgede muayene edilen 1128 hayvandan mikroskopik bakı ile 38 (%3,37)'inin *Theileria* piroplasmaları taşıdığı, PZR ile 201, buna karşın RLB ile 362'sinin *Theileria* ve/veya *Babesia* enfeksiyonları yönünden pozitif olduğu bulunmuştur. Böylece, koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* enfeksiyonlarının belirlenmesinde RLB'nin mikroskopik bakı ve PZR'den daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Türkiye'de koyun ve keçilerde theileriosis ve babesiosis hakkında ilk bulgu 1889 yılında Laveran ve Nicolle tarafından *B. ovis'in* saptanması olarak kaydedilmiş, sonraki yıllarda mikroskopik, serolojik ve moleküler yöntemler kullanarak araştırmalar yürütülmüş ve *T. lestoquardi* (42, 44), *T. ovis* (42, 43, 91, 119, 121-123), *Theileria* sp. OT3 (63), *Theileria* sp. MK (63), *B. ovis* (16, 63, 90, 92-98, 112, 121-123), *B. motasi* (97) ve *B. crassa* (135) türlerinin varlığı bildirilmiştir.

Ancak, bu türlerden *T. lestoquardi* ve *B. motasi'nin* Türkiye'deki varlığı sadece mikroskopik bakı sonuçlarına göre iddia edilmiş (42, 44, 97), *T. lestoquardi'nin* Türkiye'de İ, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde keçilerde tespit edildiği bildirilmiş, fakat enfekte hayvanların hiç birinde parazitemi oranından, şizontların varlığından ve diğer klinik bulgulardan bahsedilmemiştir (42). *B. crassa'nın* moleküler yöntemlerle yapılan bir çalışmada Türkiye'de tespit edildiği ileri sürülmüş ve AY260177 accession numarası ile gen bankasına kayıt edildiği grlmştir (135).

Son yıllarda moleküler ve serolojik yöntemlerle yapılan hiçbir çalışmada bu 3 türün varlığına ilişkin bir kayda rastlanmamıştır (91, 118, 119, 121-123). Karadeniz bölgesinden yürütülen bu çalışmanın sonuçları da yukarıdaki moleküler çalışmaları destekler niteliktedir.

Karadeniz bölgesinde koyun ve keçi theileriosis ve babesiosisine ilişkin veriler sadece mikroskopik ve serolojik çalışmalara dayanmaktadır. Mikroskopik yöntemle *B. ovis*, *B. motasi*, *Babesia* sp. ve *T. ovis*'in bulunduğu ileri sürülmüş (97), *B. ovis*'in Samsun yöresinde serolojik olarak %71,63 (101/141) ve mikroskopik olarak %67,37 (95/141) yaygınlık gösterdiği bildirilmiştir (98, 99). Karadeniz bölgesinde yürütülen bu çalışmada mikroskopik bakıda *B. ovis* piroplasm formlarına rastlanmamış, 34 koyun ve 4 keçide (%3,37) *Theileria* spp. saptanmıştır.

B. ovis'in mikroskopik prevalansı; Urfa yöresinde %1,82 (95). Malatya ve yöresinde %1,8 (92), Doğu Anadolu bölgesinde %1,5 (112), Afyon yöresinde %0,49 (94), Konya yöresinde %11,47 (96), Kayseri Yeşilhisar yöresinde %3 (121), Kayseri yöresinde %15,48 (90), Çankırı yöresinde %25,3 (81) olarak belirlenmiştir.

Theileriosis koyun ve keçilerde mikroskopik olarak Kayseri Yeşilhisar yöresinde %8 (121), Kayseri yöresinde %16,66 (79), Çankırı yöresinde %18 (81), Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde koyunlarda %18,29, keçilerde ise %2,88 (119), Orta, Güney ve Doğu Anadolu'da theileriosis şüpheli koyun ve keçide sırası ile %37,55 ve %5,62 (91) olarak bulunmuştur.

Karadeniz bölgesinden yedi ilde 1128 küçükbaş hayvan üzerinde yürütülen bu çalışmada, theileriosis mikroskopik prevalansı %3,37 olarak tespit edilmiş (koyunlarda %3,91 ve keçilerde %1,54), koyun ve keçi theileriosisinin Türkiye'nin diğer yörelerinde yapılan çalışmalarda saptanan mikroskopik prevalansa (%16,66-37,55) göre çok düşük olduğu görülmüştür. Mikroskopik bakı ile Konya, Kayseri ve Çankırı'da %11,47-25,3 gibi önemli bir prevalans gösteren (81, 90, 96), buna karşın Urfa, Malatya ve Afyon ve Doğu Anadolu'da düşük bir prevalansa (%0,49 ile 1,82) sahip olduğu belirlenen (92, 94, 95, 112,) *B. ovis*'in piroplasm formları bu çalışmada saptanamamıştır. Bu durum bölgede koyun ve keçi babesiosisinin Türkiye'nin diğer bölgelerine göre daha düşük bir yayılışa sahip olduğu kanaatini doğurmaktadır.

Koyun ve keçilerde babesiosisin serolojik prevalansının; Urfa, Malatya, Elazığ, Afyon ve Konya yörelerinde %41,02 ile %55,9 arasında değiştiği bildirilmiştir (92-96). Orta, Doğu ve Güney Anadolu bölgelerinden *Theileria* şüpheli 687 koyun ve 89 keçinin serolojik muayenesinde, sırası ile %60,26 ve 8,99 oranlarında *T. ovis* yönünden pozitiflik saptanmıştır (91).

Bu sonuçlar farklı coğrafik yapı ve iklime sahip olan bölgelerde koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* enfeksiyonlarının yaygın olduğunu göstermekle birlikte, aynı yörelerdeki düşük mikroskopik prevalanslarla karşılaştırıldığında, serolojik prevalanslarda çapraz reaksiyonlar ile yanlış pozitifliklerin gözden uzak tutulmaması gerektiği kanaatini doğurmuştur.

Türkiye’de koyun theileriosisinin moleküler yöntemlerle belirlenmesine yönelik ilk çalışma Doğu Anadolu bölgesinde yürütülmüş, bu çalışmada 218 koyuna ait kan örnekleri soy spesifik PZR ile incelenmiş, 90 örnek (%41,2) *Theileria* spp. pozitif bulunmuş, pozitif bulunan ve tür spesifik PZR ile incelenen bu örneklerin hiç birinde *T. lestoquardi*’ye rastlanmamıştır (118). Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinden 677 koyun ve 142 keçinin kullanıldığı bir çalışmada PZR ile koyunların %58,79’u, keçilerin ise %11,27’si *T. ovis* yönünden pozitif bulunmuş, bu çalışmada da *T. lestoquardi*’ye rastlanmamıştır (119). Doğu Anadolu bölgesinden 300 koyun ve 100 keçide *Babesia* enfeksiyonlarını belirlemeye yönelik bir çalışmada *B. ovis* spesifik PZR ile 32 koyun ve 1 keçide (%8,25) *B. ovis* tespit edilmiş (112), Karadeniz bölgesinde yürütülen bu çalışmada toplam 1128 koyun ve keçinin 201 tanesi (%17,82) *Babesia* ve *Theileria* enfeksiyonları yönünden PZR ile pozitif bulunmuştur.

RLB yöntemi Türkiye’de ilk defa Kayseri yöresinde koyunlarda *Theileria* ve *Babesia* türlerinin tespiti için kullanılmış, incelenen 111 örneğin %2,7’sinde *B. ovis*, %34,2’sinde *T. ovis* enfeksiyonu tespit edilmiştir (122). Daha sonra Doğu Anadolu bölgesinden 705 koyun ve 215 keçiye ait kanlarda *Theileria* ve *Babesia* türleri RLB ile araştırılmış ve *B. ovis* (%5,43), *T. ovis* (%34,56), *Theileria* sp. MK (%1,30) ve *Theileria* sp. OT3 (%0,43) tür/genotip’leri tespit edilmiştir. *Theileria* sp. MK genotipi ilk olarak bu çalışmada tanımlanmıştır. Bu bölgede koyun ve keçilerde theileriosisin yaygın olduğu (%50,55), enfeksiyonların *T. ovis*’ten kaynaklandığı, *T. lestoquardi*’nin bulunmadığı bildirilmiştir (119). Kayseri ili

Yeşilhisar yöresinde koyun ve keçilerdeki *Theileria* ve *Babesia* türlerinin belirlenmesi amacıyla rastgele seçilen 200 koyun ve 100 keçiye ait gDNA'lar RLB testi ile *T. ovis* ve *B. ovis* yönünden incelenmiş, *B. ovis*'in %3,7, *T. ovis*'in ise %37,6 oranda bulunduğu belirlenmiştir (121). Orta Anadolu bölgesindeki Kayseri, Sivas ve Yozgat illerinden 421 koyun ve 152 keçinin kullanıldığı bir çalışmada RLB ile *B. ovis* %2,6, *T. ovis* ise %33,9 oranında tespit edilmiştir (123).

Karadeniz bölgesinde yapılan bu çalışmada da Doğu Anadolu bölgesinde koyun ve keçilerde RLB yöntemi ile yapılan çalışmaya benzer olarak %0,62 oranında *Theileria* sp. MK genotipi tespit edilmiş, *Theileria* sp. OT3 ise %2,04'lük oran ile Doğu Anadolu bölgesinden yüksek çıkmıştır. Türkiye'nin diğer yörelerinde yüksek oranda yayılış gösteren *T. ovis*'in (%37,6- 33,3), bu bölgede de en yaygın tür (%28,99) olduğu görülmüş, diğer bölgelerde %2,7-5,4 arasında yayılış gösteren *B. ovis* ise Karadeniz bölgesinde %0,44 oranında tespit edilmiştir. Genel anlamda her iki türün de diğer bölgelere göre düşük bir yayılış gösterdiği ortaya çıkmış olmakla birlikte, *B. ovis*'in bu bölgede beklenen seviyenin çok altında olması, Türkiye'de koyun babesiosisinin özellikle mikroskobik ve serolojik teşhisinde geçmişte önemli yanılgılar yaşandığı gerçeğini ortaya çıkarmıştır.

Theileria sp. OT3 ilk olarak İspanyada koyunlarda (62), *Theileria* sp. MK ise Türkiye'de koyun ve keçilerde tespit edilmiştir (63). Türkiye'de koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin tespitine yönelik RLB ile yapılan çalışmalarda sadece Altay ve ark. (63) *Theileria* sp. OT3 ve

Theileria sp. MK probunu kullanmıştır. Bu sebeple diğer moleküler çalışmalarda *Theileria* sp. OT3 ve *Theileria* sp. MK'nın bulunuşuna ilişkin bir sonuca rastlanmamıştır. Karadeniz bölgesinde yürütülen bu çalışmada 23 hayvanda (%2,04) *Theileria* sp. OT3, 7 hayvanda (%0,62) ise *Theileria* sp. MK tespit edilmiştir. Türkiye'nin diğer bölgelerinde de saptanmasının muhtemel olduğu düşünülen bu genotiplerle ilgili patojenite ve vektör kene konularında detaylı çalışmalar yapılması gerektiği kanaati doğmuştur.

Türkiye'de bu güne kadar koyun ve keçilerde 16'sı Ixodidae, ve biri Argasidae ailesinden olmak üzere toplam 17 kene türü tespit edilmiş, *bu türlerin*; *H. excavatum*, *H. detritum*, *H. marginatum*, *H. aegyptium* *R. sanguineus*, *R. bursa*, *R. turanicus*, *H. parva*, *H. sulcata*, *H. punctata*, *H. concinna*, *D. marginatus*, *D. niveus*, *B. annulatus* *B. kohlsi*, *I. ricinus* ve *O. lahorensis* olduğu bildirilmiştir. (73, 74, 77, 78, 80, 82-84, 86, 99, 136). Karadeniz bölgesinde koyun ve keçilerdeki kene türlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar sınırlıdır. Samsun ilinde koyun ve keçilerde, *I. ricinus*, *R. sanguineus*, *R. bursa*, *H. punctata*, *H. sulcata*, *H. concinna*, *D. marginatus* ve *D. niveus*'un varlığı ortaya konmuş (89), Kelkit vadisi olarak isimlendirilen bir bölgede koyunlardan 17 ve keçilerden 396 kene toplanmış, kenelerin *H. marginatum* (48 adet) ve *R. bursa* (365 adet) olduğu saptanmıştır (87). Karadeniz bölgesinde tarafımızdan yapılan bu çalışmada, koyunlarda 12, keçilerde ise 10 farklı tür saptanmış, Ixodidae ailesinden *R. turanicus*, *H. parva*, *R. bursa*, *D. marginatus*, *R. sanguineus*, *I. ricinus*, *H. punctata*, *H. marginatum*, *H. sulcata*, *H. excavatum*, *H. concinna* ve *H. detritum* türlerinin varlığı ortaya konmuş, *R. sanguineus* ve

H. excavatum sadece koyunlarda görülmüştür. Önceki yayınlarda Türkiye'nin diğer bölgelerinde varlığı bildirilen *B. annulatus*, *B. kohlsi*, *H. aegyptium* ve *O. lahorensis* ile Samsun'da da bulunduğu kaydedilen *D. niveus*'a (77, 80-84, 89) bu çalışmada rastlanmamıştır. Bu çalışmada koyun ve keçilerde saptanamayan *O. lahorensis*'in hayvan meskenlerinin çatlak ve yarıklarında bulunduğu (137), *B. annulatus*'un daha çok sığırlarda görüldüğü ve Güney Marmara bölgesi sığırlarında en fazla rastlanan tür olduğu buna karşın koyun ve keçilerde çok az sayıda bulunduğu (78), *D. niveus*'a Çankırı ve Van yöresinde çok az rastlandığı (81, 82), Güney Marmara ve Kayseri'de koyunlarda görülmediği (78, 86), *H. aegyptium*'un ise normalde kaplumbağa kenesi olduğu (74) kaydedilmiştir.

Türkiye'nin farklı bölgelerinde kene enfestasyon oranlarının koyunlarda %21 ile %50, keçilerde ise %6 ile %59,33 arasında değiştiği bildirilmiştir (79-86). Karadeniz bölgesinde yürütülen bu çalışmada, koyun ve keçilerde tespit edilen kene enfestasyon oranlarının sırası ile %30,77 ve %32,89 olduğu ve diğer bölgelerdeki sonuçlar ile benzerlik arz ettiği saptanmıştır.

Koyun ve keçilerde yapılan çalışmalarda en yaygın türlerin Van yöresinde *R. turanicus*, *H. parva* ve *D. marginatus* Elazığ yöresinde *Rhipicephalus* ve *Haemaphysalis* (*H. parva* ve *H. sulcata*), Burdur yöresinde *R. turanicus*, Ankara'da *Rhipicephalus* ve *Haemaphysalis* soylarına bağlı türler oldukları belirlenmiştir. (82, 83, 85). Bu çalışmada ise

en yaygın türler koyunlarda *R. turanicus*, *H. parva* ve *D. marginatus*; keçilerde ise *R. bursa*, *R. turanicus* ve *H. parva* olarak belirlenmiştir.

Türkiye’de koyun ve keçilerde kene türlerinin mevsimsel aktivitelerini belirlemeye yönelik araştırmalar yapılmıştır. *Rhipicephalus* spp.; Van yöresinde ilkbahar, yaz ve sonbaharda (82), Elazığ yöresinde ilkbahar ve yazın (83), Zara yöresinde yaz aylarında (80), Burdur yöresinde Nisan – Ağustos ayları arasında (84), Samsun yöresinde ilkbahar ve yazın (89) tespit edilmiştir.

Haemaphysalis spp.; Van yöresinde sonbahar, kış ve ilkbaharda (82), Elazığ yöresinde ilkbahar, sonbahar ve kışın (83), Zara yöresinde ilkbahar ve kışın (80), Samsun yöresinde yaz, sonbahar ve kış aylarında belirlenmiştir (89). *H. parva*’ya Burdur yöresinde sonbaharda, Zara yöresinde ise sonbahar ve kışın sığır, koyun ve keçiler üzerinde rastlanmıştır (80, 84).

B. annulatus’un ilkbahar ve sonbaharda daha fazla olmak üzere yıl boyunca hayvanlar üzerinde bulunduğu (42), Burdur yöresinde Şubat, Mart ve Ağustos ayları dışındaki aylarda sığırlarda rastlandığı (84), Zara yöresinde ilkbaharda görüldüğü (80), Elazığ yöresinde çoğunlukla ilkbahar mevsiminde olmak üzere sığır ve koyunlarda bulunduğu (83) ifade edilmiştir.

Dermacentor türlerinin özellikle sonbaharda bulunduğu bildirilmiş (42), Zara yöresinde sonbahar (80), Elazığ yöresinde ilkbahar ve yaz (83)

ve Samsun yöresinde ilkbahar ve sonbaharda (89) aktif olduğu kaydedilmiştir.

Hyalomma türlerinin Elazığ yöresinde ilkbahar ve yaz (83), Zara yöresinde yazın (80); *I. ricinus*'un Samsun yöresinde yaz, sonbahar ve kış aylarında (89) hayvanlardan kan emdiği saptanmıştır.

Karadeniz bölgesinde tarafımızdan yapılan bu çalışmada *D. marginatus* sonbahar, kış ve ilkbahar aylarında daha fazla olmak üzere tüm mevsimlerde, *H. concinna* kışın ve daha az olarak da yaz aylarında, *H. parva* ilkbahar, sonbahar ve kışın, *H. punctata* ve *H. sulcata* çoğunlukla sonbahar, daha az olarak da kış ve ilkbaharda, *Hyalomma* türleri ilkbahar ve yaz aylarında, *I. ricinus* bütün mevsimlerde, *R. bursa* yazın, *R. sanguineus* ilkbahar ve *R. turanicus* çoğunlukla yaz ve ilkbahar daha az olarak da sonbaharda hayvanlar üzerinde bulunmuştur.

Sonuç olarak;

- Karadeniz bölgesindeki koyun ve keçilerde *T. ovis*, *Theileria* sp. OT3, *Theileria* sp. MK ve *B. ovis* tür ve genotiplerinin varlığı ile bunların moleküler prevalansı tespit edilmiştir.
- Koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin teşhisinde kullanılan metotlardan RLB'nin PZR ve mikroskopik bakıya göre çok daha özgül ve duyarlı olduğu görülmüştür.
- Karadeniz bölgesinde koyun ve keçilerde *Theileria* enfeksiyonlarının *Babesia* enfeksiyonlarına göre daha fazla olduğu ve bunlardan *T.*

ovis'in en yaygın tür olduğu, çeşitli ülkelerde koyun ve keçilerde tespit edilen *T. lestoquardi*'nin ise bu bölgede bulunmadığı ortaya konmuştur.

- Bölge iklim ve bitki örtüsü yönünden kene türlerinin yayılışına uygundur. Bu sebeple, *Babesia* türlerinin olası vektörleri olarak kabul *Rhipicephalus* ve *Haemaphysalis*'lere ek olarak bölgede *Ixodes* türlerinin de bulunması, buna karşın koyun ve keçilerde *Babesia* enfeksiyonlarının düşük prevalansı, vektör kenelerin tespitine yönelik yeni araştırmaların yapılması gerektiği sonucunu doğurmaktadır.
- Doğu Anadolu'da olduğu gibi Karadeniz bölgesinde de *Theileria* sp. OT3 ve *Theileria* sp. MK'nın bulunduğu, bu genotiplerin öncelikle tür olup olmadığının açıklığa kavuşturularak, Türkiye'nin diğer bölgelerindeki yayılışları ile vektörleri ve patojenitelerinin, detaylı olarak ortaya konması gerektiği sonucuna varılmıştır.
- Karadeniz bölgesinde koyun ve keçilerde 12 farklı kene türü (*H. parva*, *R. bursa*, *R. turanicus*, *D. marginatus*, *R. sanguineus*, *H. punctata*, *I. ricinus*, *H. marginatum*, *H. sulcata*, *H. excavatum*, *H. concinna*, *H. detritum*) tespit edilmiştir. Bölgede koyun ve keçilerde *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis* ve *Dermacentor* soyuna bağlı kene türleri ile enfestasyonların *Hyalomma* ve *Ixodes* türlerine göre daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır.

- Karadeniz bölgesinde koyun ve keçiler üzerinde *Rhipicephalus* ve *Hyalomma*'ların ilkbahar ve yaz; *Haemaphysalis*'lerin kış, ilkbahar ve sonbahar; *Dermacentor* ve *Ixodes*'lerin ise bütün mevsimlerde görüldüğü belirlenmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Friedhoff KT. Tick-borne disease of sheep and goats caused by *Babesia*, *Theileria* or *Anaplasma* spp. *Parassitologia* 1997; 39: 99-109.
2. Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology* 2004; 129(Suppl): 3-14.
3. Friedhoff K.T. Transmission of *Babesia*. In: M. Ristic, (Editor). *Babesiosis of domestic animals and man*. Florida: Boca Raton 1988: 23–52.
4. Alani AJ, Herbert IV. The morphometrics of *Babesia motasi* (Wales) and its transmission by *Haemaphysalis punctata* (Canestrini and Fanzago, 1877) to sheep. *Vet Parasitol* 1988; 30: 87-95.
5. Levine ND. *Veterinary Protozoology*. Ames, Iowa: Iowa State Uni, 1985.
6. Uilenberg G, Rombach MC, Perie NM, Zwart D. Blood parasites of sheep in the Netherlands. II. *Babesia motasi* (Sporozoa, Babesiidae). *Veterinary Quarterly* 1980; 2: 3–14.
7. Hashemi-Fesharki R, Uilenburg G. *Babesia crassa* n.sp. (Sporozoa, Babesiidae) of domestic sheep in Iran. *Vet Quart* 1981; 2: 3-14.
8. Sarwar SM. A hitherto undescribed piroplasm of goats (*Piroplasma taylori*). *The Indian Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry* 1935; 5: 171-176.
9. Ray HN, Raghavachari K. Observations on *Babesia foliata* n.sp. from a sheep. *Indian Journal Veterinary Science* 1941; 11: 239–242.
10. Uilenberg G. Babesiosis. In: Sevcik MW (Editor). *Encyclopedia of Arthropod-Transmitted Infections of Man and Domesticated Animals*. Wallingford: CABI Publishing, 2001.
11. Uilenberg G. *Babesia*-a historical overview. *Vet Parasitol* 2006; 138(1-2): 3-10.
12. Hashemi-Fesharki R. Tick-borne diseases of sheep and goats and their related vectors in Iran. *Parassitologia* 1997; 39: 115-117.
13. Babes V. Sur l'hémoglobinurie bactérienne du bœuf. *CR. Acad Sci* 1888; 107: 692-694.
14. Smith T, Kilborne FL. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever, 8th and 9th Repts. *Bur Anim Industr U.S. Dep. Agric* 1893; 177–304.
15. Starcovici C. Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krankheiten, die seuchenhafte Hämoglobinurie des Rindes (Babes), dans Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). *Zbl Bakt I Abt* 1893; 14: 1–8.

16. Göksu K. Yerli koyunlarımızda Babesidae ve Theileridae'lerin epizootiolojik durumları ile biolojilerine dair araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 1967.
17. Anonymous. "*Systema Naturae 2000*" <http://sn2000.taxonomy.nl/> 19.11.2011.
18. Allsopp MT, Cavalier-Smith T, De Waal DT, Allsopp BA. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology* 1994; 108: 147–152.
19. Mahoney DF. *Babesia* of domestic animals. In: Kreier JP. (Editor). *Parasitic Protozoa* Newyork: Academic Pres 1977: 1-52.
20. Mehlborn H. Cellular Organisation of Parasite Protozoa. In: Stephen H, Gillespie and Dickson D Topley and Wilson (Editors). *Microbiology and Microbial Infections. Parasitology*. Despommier: ASM Press, 2005.
21. Levine ND. Introduction to the Apicomplexa. Lee JJ, Hutner SH, Bovee EC (Editors). *An Illustrated Guide to the Protozoa* Society of Protozoologists. Kansas: Lawrence, 1985.
22. Inci A, Düzlü Ö, İça A. Babesiidae. Dumanli N, Karaer Z (Editörler). *Veteriner Protozooloji*. Ankara: Medisan Yayınevi 2010: 183-206.
23. Rudzinska MA. Host-cell-parasite relationships. In: Ristic M, Kreier JP (Editors). *Babesiosis*. New York: Academic Press 1981: 88-135.
24. Mehlhorn H, Schein E. The piroplasms: life cycle and sexual stages, *Adv Parasitol* 1984; 23: 37–103.
25. De Vos AJ, Dalgliesh RJ, Callow LL. *Babesia*. In: Soulsby EJJ (Editor). *Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis*, Vol. III Boca Raton: CRC Press Inc 1987: 1269.
26. Wenyon CM. *Protozoology, A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists*. Vol II, New York: Hafner Publish Co, 1965.
27. Friedhoff KT. Morphological aspects of *Babesia* in the tick. In: Ristic M, Kreier JP, (Editors). *Babesiosis*. New York: Academic Press 1981: 143-164.
28. Kjemtrup AM, Conrad PA. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *International Journal for Parasitology* 2000; 30: 1323-1337.
29. Kreier JP, Baker JR. *Parasitic Protozoa*. Boston: Allen and Unwin Inc, 1987.
30. Purnell RE. Babesiosis in Various Hosts. In: Ristic M, Kreier JP (Editors). *Babesiosis*. New York: Academic Press 1981.
31. Friedhoff KT, Smith RD. Transmission of *Babesia* by ticks. In: Ristic, M, Kreier JP (Editors). *Babesiosis*, New York: Academic Press 1981.
32. Göksu K. *Rhipicephalus bursa* Canestrini ve Fanzago, 1877 (Acarina: Ixodidae)'nın saha ve laboratuvar şartlarında biyo-ekolojisi üzerinde araştırmalar. *AÜ Vet Fak Derg* 1969; 16(4): 295-312.
33. Kuttler K.L. World-wide impact of babesiosis. In: Ristic M. (Editor). *Babesiosis of domestic animals and man*. Florida: Boca Raton 1988: 1–22.

34. Hoosmand- Rad P, Hawa NY. Malignant theileriosis of sheep and goats. Trop Anim Health Pro 1973; 5: 97-102.
35. Luo J, Yin H. Theileriosis of sheep and goats in China. Trop Anim Health Prod 1997; 29(4): 8-10.
36. Schnittger L, Yin H, Qi B, et al. Simultaneously detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasite infecting small ruminants by reverse line blotting. Parasitol Res 2004; 92: 189-196.
37. Yin H, Schnittger L, Luo J, Seitzer U, Ahmed JS. Ovine theileriosis in China: a new look at an old story. Parasitol Res 2007; 101(2): 191-195.
38. Yin H, Liu Z, Guan G, et al. Detection and differentiation of *Theileria luwenshuni* and *T. uilenbergi* infection in small ruminants by PCR. Transbound Emerg Dis 2008; 55(5-6): 233-237.
39. Alani AJ, Herbert IV. Pathogenesis of infection with *Theileria recondita* (Wales) isolated from *Haemaphysalis punctata* from north Wales. Vet Parasitol 1988; 28(4): 293-301.
40. Brown CG, Ilhan T, Kirvar E, et al. *Theileria lestoquardi* and *T. annulata* in cattle, sheep and goats. In vitro and in vivo studies. Ann N Y Acad Sci 1998; 849: 44-51.
41. Du Toit JP. Theileriosis. Rept Sect Meeting. II. Intern Vet Congress 1930; 1-34. Mimioğlu M. (Çeviren) Türk Veteriner Hekimleri Dergisi, 1956; 116-117: 2952-2969.
42. Hoffmann G, Hörchner F, Schein E, Garber H. Saisonales auftreten von zecken und piroplasmen bei haustieren in den asiatischen provinzen der Türkei. Berl Münch Tieraerztl Wschr 1971; 8: 152-156.
43. Lestoquard F, Ekrem I. Les piroplasmoses du mouton en Turquie. Bull Soc Pathol Exot 1931; 2: 822-826.
44. Bauman R. Die kleinasiatische schafftheileriose. Berliner and Meunchener Tieraerztliche Wonschrift 1939; 30: 469-474.
45. Levine ND. Protozoon Parasites of Domestic Animals and of Man. 2th Ed. Minneapolis: Burgers Publish, 1973.
46. Dinçer Ş. Theileiosis etkenlerinin taksonomisi ve morfolojisi. Sayın F (Editör). Theileriosis. İzmir: Bilgehan Basımevi: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No 5 1985: 2-28.
47. Uilenberg G. Theilerial Species of Domestic Livestock. In: Irvın AD, Cunningham MP, Young AS. (Editors). Advances in the Control of Theileriosis. Martinus Nijhoff Publishers, 1981.
48. Uilenberg G, Schreuder BEC. Studies on Theileridae (sporozoa) in Tanzania. Tick transmission of *Haematoxeneus veliferus*. Tropenmedizin und Parasitologie 1976; 25: 207-216.

49. Dumanlı N. *Theileria annulata*'nın sebep olduğu sığır theileriosisinin *Hyalomma excavatum* ile nakli üzerinde deneysel araştırmalar. Doğa-TU Veteriner ve Hayvancılık Dergisi 1987; 11(1): 14-20.
50. Bhattacharyulu SD, Dhar S, Gautam OP, Malik PD. Experimental transmission of theileriosis in sheep, a preliminary report. HAU J Res 1973; 2(3): 202-206.
51. Karaer Z. Theileriosisin Bulaşması. Sayın F. (Editör). Theileriosis. İzmir: Bilgehan Basımevi: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No 5 1985: 47-76.
52. Soulsby E.J.L. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. London: Bailliere Tindall, 1986.
53. Salih DA, El Hussein AM, Hayat M, Taha KM. Survey of *Theileria lestoquardi* antibodies among Sudanese sheep. Vet Parasitol 2003; 111(4): 361-367.
54. Sisodia RS, Gautam OP. Experimental cases of *Theileria hirci* infection in sheep and goats. Ind J Anim Sci 1983; 53: 162-166.
55. Jansen BC, Neitz WO. A discussion on the classification of Theileridae. J Ond Vet Res 1956; 27: 7-18.
56. Neitz WO. Theileriosis, Gondriosis and Cytauxzoonoses: A review. Onderstepoort J Vet Res 1957; 27: 275-430.
57. Gill HS, Bhattacharyulu Y, Gill BS. Attempts to transmit *Theileria ovis* through the ticks *Haemaphysalis bispinosa* and *Rhipicephalus haemaphysalis*. Trop Anim Health Prod 1980; 12(1): 61.
58. Mehlhorn H, Schein E, Warnecke M. Electron-microscopic studies on *Theileria ovis* Rodhain, 1916. Development of kinets in the gut of vector tick, *Rhipicephalus evertsi evertsi* Neumann, 1897 and their transformation within cells of salivary glands. J Protozool 1979; 26(3): 377-385.
59. Li Y, Guan G, Ma M, et al. *Theileria ovis* discovered in China. Exp Parasitol 2011; 127(1): 304-307.
60. Sayın F, Yukarı BA, Nalbantoğlu S, Deniz A, Duru O. Türkiye'de koyun ve keçilerde theileriosis'in epidemiyolojisi üzerine araştırmalar. Tübitak projesi son raporu. Proje no: VHAG-1339; 1999.
61. Aktas M, Altay K, Dumanli N. PCR-based detection of *Theileria ovis* in *Rhipicephalus bursa* adult ticks. Vet Parasitol 2006; 140: 259-263.
62. Nagore D, García-Sanmartín J, García-Pérez AL, Juste RA, Hurtado A. Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in a sheep population from Northern Spain. Int J Parasitol 2004; 34: 1059-1067.
63. Altay K, Dumanli N, Aktas M. Molecular identification, genetic diversity and distribution of *Theileria* and *Babesia* species infecting small ruminants. Vet Parasitol 2007; 147: 161-165.
64. Guan GQ, Ma ML, Moreau E, et al. A new ovine *Babesia* species transmitted by *Hyalomma anatolicum anatolicum*. Exp Parasitol 2009; 122: 261-267.

65. Yin H, Lu WS, Luo JX, et al. Isolation and morphological observation of *Babesia motasi* and *Babesia ovis* in China. Chin J Vet Sci Technol 1997; 10: 7–9.
66. Guan GQ, Yin H, Luo JX, et al. Transmission of *Babesia* sp. to sheep with field-collected *Haemaphysalis qinghaiensis*. Parasitol Res 2002; 88: 22-24.
67. Guan GQ, Yin H, Luo JX, et al. Isolation of a large ovine *Babesia* sp. in Xinjiang, China (in Chinese). Chin J Vet Sci Technol 2001; 31: 35-36.
68. Bai Q, Liu GY, Liu DK, Ren JX, Li X. Isolation and preliminary characterization of a large *Babesia* sp. from sheep and goats in the eastern part of Gansu Province, China. Parasitol Res 2002; 88: 16-21.
69. Liu AH, Yin H, Guan GQ, et al. At least two genetically distinct large *Babesia* species infective to sheep and goats in China. Vet Parasitol 2007; 147: 246–251.
70. Niu Q, Luo J, Guan G, et al. Detection and differentiation of ovine *Theileria* and *Babesia* by reverse line blotting in China. Parasitol Res 2009; 104(6): 1417-1423.
71. Guan G, Moreau E, Liu J, et al. *Babesia* sp. BQ1 (Lintan): Molecular evidence of experimental transmission to sheep by *Haemaphysalis qinghaiensis* and *Haemaphysalis longicornis*. Parasitol Int 2010; 59(2): 265-267.
72. Horak IG, Camicas JL, Keirans JE. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodidae): a world list of valid tick names. Exp App Acaro 2002; 28: 27-54.
73. Aydın L, Bakırcı S. Geographical distribution of ticks in Turkey. Parasitol Res 2007; 101(2): 163-166.
74. Merdivenci A. Türkiye Keneleri Üzerine Araştırmalar. 1. Baskı, İstanbul: Kutulmuş Matbaası, 1969.
75. Bakırcı S, Saralı H, Aydın L ve ark. *Hyalomma rufipes* (Koch, 1844) infesting cattle in the West Aegean region of Turkey. Turk J Vet Anim Sci 2011; 35(5): 359-363.
76. Aydın MF, Balkaya I, Aktas M, Dumanlı N. Erzurum ilinde üç kırmızı tilkide (*Vulpes vulpes*) kene (Ixodoidea) ve pire (Siphonaptera) türleri. Türkiye Parazitolo Derg 2011; 35: 110-113.
77. Güler S, Özer E, Erdoğan SZ, Köroğlu E, Bektaş İ. Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kene (Ixodidae) türleri. Doğa-TU Vet ve Hay D 1993; 17: 229-231.
78. Aydın L. Güney Marmara ruminantlarında görülen kene türleri ve yayılışları. Türkiye Parazitolo Derg 2002; 24(2): 194-200.
79. İnci A, Nalbantoğlu S, Çam Y ve ark. Kayseri yöresinde koyun ve keçilerde theileriosis ve kene enfestasyonları. Turk J Vet Anim Sci 2003; 27: 57-60.
80. Mamak N, Gençler L, Özkanlar YE, Özçelik S. Sivas-Zara yöresindeki sığır, koyun ve keçilerde kene türlerinin belirlenmesi ve sağaltımı. Türkiye Parazitolo Derg, 2006; 30 (3): 209-212.

81. İnci A, Yukarı BA, Sayın F. Çankırı yöresinde bazı koyun ve keçi sürülerinde babesiosis ve theileriosis etkenlerinin mikroskopik kan muayenesiyle araştırılması. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1998; 45: 105-113.
82. Akdemir C. Van yöresi koyunlarında bulunan kene türlerinin (fam: ixodidae) tespiti ve epidemiyolojisi üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2001.
83. Sayın F, Dumanlı N. Elazığ bölgesinde evcil hayvanlarda görülen kene (Ixodoidea) türleri ile ilgili epizootiyolojik araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1982; 29 (3-4): 344-362.
84. Yukarı BA, Umur Ş. Burdur yöresindeki sığır, koyun ve keçilerde kene (ixodoidea) türlerinin yayılışı. Turk J Vet Anim Sci 2002; 6, 1263-1270.
85. Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z ve ark. Status of tick infestation of sheep and goats in Turkey. Parassitologia 1997; 39, 145-152.
86. Yay M, Yazar S, Aydın L, Şahin İ. Kayseri Yöresi'nde sığır ve koyunlarda kene türlerinin araştırılması. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2004; 13: 25–29.
87. Tonbak S, Aktas M, Altay K, et all. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: genetic analysis and tick survey in Turkey. J Clin Microbiol 2006; 44(11), 4120-4124.
88. Aktas M, Vatansever Z, Altay K, Aydın MF, Dumanli N. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from Turkey. Trans R Soc Trop Med Hyg 2010; 104, 10-15.
89. Zeybek H. Samsun yöresi koyun ve kuzularında paraziter fauna saptama çalışmaları. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1980; 27: 215-236.
90. İnci A, Karaer Z, İça A. Kayseri yöresinde koyun ve keçilerde babesiosis. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2002; 16(1): 79-83.
91. Sayın F, Nalbantoğlu S, Yukarı BA, Çakmak A, Karaer Z. Epidemiological Studies on Sheep and Goat *Theileria* infection. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2009; 56: 127-129.
92. Aktaş M, Düzgün A, Babür C. Seroprevalence of *Babesia ovis* in Malatya. Turk J Vet Anim Sci 2001; 25: 241-243.
93. Dumanlı N, Köroğlu E, Düzgün A, Angın M, Küçükerden N. Elazığ yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*'in seroprevalansı. Turk J Vet Anim Sci 1997; 21: 183-186.
94. Çiçek H, Düzgün A, Emre Z, Karaer Z. Seroprevalance of *Babesia ovis* in sheep around Afyon. Turk J Vet Anim Sci 2004; 28: 683-686.
95. Emre Z, Düzgün A, İriadam M, Sert H. Seroprevalence of *Babesia ovis* in Awassi sheep in Urfa, Turkey. Turk J of Vet Anim Sci 2001; 25 (5): 759-762.
96. Sevinç F, Dik B. Konya yöresindeki koyunlarda *Babesia ovis*'in ELISA ile teşhisi. Veteriner Bilimleri Dergisi 1996; 12(2): 73-79.
97. Açııcı M, Umur Ş, Kurt M, Beyhan YE, Pekmezci GZ. Orta Karadeniz bölgesi ve Sivas yöresi sığır ve koyunlarında kan parazitlerinin retrospektif incelenmesi. XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kayseri ve Ürgüp 2007; s:166.

98. Çakmak A, Dinçer S, Karaer Z. Samsun yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*'in serodiagnozu üzerine araştırmalar. AÜ Vet Fak Derg 1991; 38: 242-251.
99. Sayin F, Dincer S, Karaer Z, et al. Status of the tick-borne diseases in sheep and goats in Turkey. Parasitologia 1997; 39: 153-156.
100. Guo S, Yuan Z, Wu G, et al. Epidemiology of ovine theileriosis in Ganan region, Gansu Province, China. Parasitol Res 2002; 88: 36-37.
101. Yin H, Liu G, Luo J, et al. Observation on the schizont stage of an unidentified *Theileria* sp. in experimentally infected sheep. Parasitol Res 2003; 91(1): 34-39.
102. Brown CG. Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle. Parasitologia 1990; 32(1): 23-31.
103. Değer S. Van ilinde koyunlarda babesiosisin seroepidemiolojisi üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1990.
104. Karatepe M, Karatepe B, Çakmak A, Nalbantoglu S. Niğde yöresinde koyun ve keçilerde *Babesia ovis*'in prevalansı. Türkiye Parazitoloj Derg 2003; 27: 18-20.
105. Yukarı BA, Çakmak A, Karaer Z, Düzgün A, Yaralı C. Ankara yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*'in IFA ve ELISA yöntemleri ile serodiagnozu. Türk Veteriner Hekimleri Dergisi 1996; 67: 42-45.
106. Duzgun A. Çanakkale yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*'in seroepidemiolojisi. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1997.
107. Gao YL, Yin H, Luo JX, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Theileria* sp. infection in sheep. Parasitol Res 2002; 88: 8-10.
108. Burridge MJ, Brown CG, Kimber CD. *Theileria annulata*: cross-reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. Exp Parasitol 1974; 35(3): 374-380.
109. Gubbels MJ, d'Oliveira C, Jongejan F. Development of an indirect Tamsi enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7: 404-411.
110. Leemans I, Brown D, Hooshmand-Rad P, Kirvar E, Uggla A. Infectivity and cross-immunity studies of *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in sheep and cattle: I. In vivo responses. Vet Parasitol 1999; 82(3): 179-92.
111. Altay K, Aydin MF, Dumanli N, Aktas M. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. Vet Parasitol 2008; 158(4): 295-301.
112. Aktas M, Altay K, Dumanli N. Determination of prevalence and risk factors for infection with *Babesia ovis* in small ruminants from Turkey by polymerase chain reaction. Parasitol Res 2007; 100(4): 797-802.
113. d'Oliveira C, van der Weide M, Habela MA, Jacquiet P, Jongejan F. Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 2665- 2669.

114. 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.
115. Altay K, Aydin MF, Uluisik U, Aktas M, Dumanli N. Use of multiplex PCR for the diagnosis of *Theileria annulata* and *Theileria buffeli*. Turkiye Parazitoloj Derg 2008; 32(1): 1-3.
116. Altay K, Aktas M, Dumanli N, Aydin MF. Evaluation of a PCR and comparison with RLB for detection and differentiation of *Theileria* sp. MK and other *Theileria* and *Babesia* species of small ruminants. Parasitol Res 2008; 103(2): 319-323.
117. Vatansever Z, İa A, Deniz A, ve ark. Ankara Yöresinde kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının reverse line blotting (RLB) ve indirek floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması. XIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Konya 2003; s:94.
118. Aktas M, Altay K, Dumanli N. Survey of *Theileria* parasites of sheep in eastern Turkey using polymerase chain reaction. Small Ruminant Research 2005; 60: 289-293.
119. Altay K, Aktas M, Dumanli N. *Theileria* infections in small ruminants in the east and southeast Anatolia. Turkiye Parazitoloj Derg 2007; 31(4): 268-271.
120. Rijpkema SG, Molkenboer MJ, Schouls LM, Jongejan F, Schellekens JF. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. Journal of Clinical Microbiology 1995; 33: 3091-3095.
121. Saraylı H, İnci A, İca A, Yıldırım A, Düzlü Ö. Yeşilhisar yöresindeki koyun ve keçilerde *Babesia* etkenlerinin Reverse Line Blotting (RLB) yöntemiyle araştırılması. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2006; 15(3): 181-188.
122. İa A, Yıldırım A, İnci A. Kayseri yöresinde koyunlarda kan protozoonlarının Reverse Line Blotting Yöntemi ile Araştırılması. XIV Ulusal Parazitoloji Kongresi, Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir 2005; s:161.
123. İnci A, İca A, Yıldırım A, Düzlü Ö. Identification of *Babesia* and *Theileria* species in small ruminants in Central Anatolia (Turkey) via reverse line blotting. Turk J Vet Anim Sci 2010; 34(2): 205-210.
124. Anonim. "Türkiye İstatistik Kurumu Hayvancılık İstatistikleri Veri Tabanı" <http://www.tuik.gov.tr/hayvancilikapp/hayvancilik.zul> 19.11.2011
125. Estrada-Pena A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: a guide to identification of species. First Edition. Published by University of Zaragoza, Spain: 2004; 131.
126. Aktas M, Altay K, Dumanli N. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of *Babesia ovis* infection in sheep and goats. Vet Parasitol 2005; 133: 277-281.

127. 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(4): 273-286.
128. İa A. Sıırlarda bazı *Babesia* türlerinin reverse line blotting ve indirek floresan antikor testi ile karşılaştırmalı tanısı üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2003.
129. Anonymous. “*Principles of the Reverse Line Blot Hybridization Assay*” http://www.icctd.nl/fileadmin/user_upload/Presentations/Nijhof001.zip 19.11.2011
130. Figueroa JV, Buening GM. Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne haemoparasites of veterinary importance. *Vet Parasitol* 1995; 75: 75-92.
131. Almeria S, Castella J, Ferrer D, Sparagona O, Estrada-Pena A. First report of *Babesia bovis* in Spain. *The Veterinary Record* 2001; 149: 716-717.
132. Kirvar E, İlhan T, Katzer F, et all. Detection of *Theileria lestoquardi* (hirci) in ticks, sheep, goats using polymerase chain reaction. *Ann NY Acad Sci* 1998; 849: 52-62.
133. d'Oliveira C, van der Weide M, Jacquet P, Jongejan F. Detection of *Theileria annulata* by the PCR in ticks (Acari: Ixodidae) collected from cattle in Mauritania. *Exp Appl Acarol* 1997; 21: 279–291.
134. Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM. Multiplex polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet Parasitol* 1993; 50: 69–81.
135. Schnittger L, Yin H, Gubbels MJ, et all. Phylogeny of sheep and goat *Theileria* and *Babesia* parasites. *Parasitol Res* 2003; 91: 398–406
136. zer E, Güler S. Mardin'de keçilerde *Boophilus kohlsi*'nin bulunuşu. *Turk J Vet Anim Sci* 1994; 18(1): 23-26.
137. Mimioğlu M. Veteriner ve Tıbbi Artropodoloji. 1. Baskı, Ankara: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, 1973.

8. ÖZGEÇMİŞ

Doğum Yeri ve Yılı:	Konya, 1983
E-posta :	veterinermfa@gmail.com
Medeni Hali:	Evli

Eğitim Bilgileri

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Yılı
Türkiye	Fırat	Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Veteriner Programı	Parazitoloji	Doktora	2006-
Türkiye	Selçuk	Veteriner Fakültesi	Veteriner Fakültesi	Yüksek Lisans	2001-2006

Akademik/Meslekte Deneyim

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Bitlis Eren Üniversitesi	Türkiye	Bitlis	Bitlis Sağlık Yüksekokulu	Öğretim Görevlisi	2009-2011
Fırat Üniversitesi	Türkiye	Elazığ	Parazitoloji	Doktora Öğrencisi	2006-2011

Uzmanlık Alanları

Veteriner Parazitoloji (Protozooloji, Kan Parazitleri, Keneler, Parazitolojide Moleküler Metotlar)

Proje Deneyimi

Proje Adı	Kurum	Tarih	Görev
TOVAG 106 O 416 Doğu Karadeniz Bölgesinde Sığırlarda ve Kenelerde <i>Theileria</i> , <i>Babesia</i> ve <i>Anaplasma</i> Türlerinin Revers Line Blotting (RLB) Yöntemi ile Araştırılması	Fırat Üniversitesi	01.09.2006- 01.09.2009	Bursiyer
TOVAG 109 O 766 Karadeniz Bölgesinde Koyun ve Keçilerde <i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> Türlerinin Mikroskopik Ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi	Fırat Üniversitesi	15.04.2010- 15.04.2012	Bursiyer
DPT Bitlis Eren Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma Merkezi Laboratuvarı Kurulması (DPT Projesi).	Bitlis Eren Üniversitesi	2009-2011	Araştırmacı

Diğer Akademik Faaliyetler

Toplam Atıf Sayısı: 31

SCI Kapsamındaki Dergilerdeki Atıf Sayısı: 25

Diğer Faaliyetler

1. Türkiye Parazitoloji Derneği (üye)
2. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi. 1-6 Kasım 2009. Adana.
3. Moleküler Biyoloji Yöntemleri Uygulamalı Eğitimi, TÜBİTAK
Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji
Enstitüsü İmmünogenetik Laboratuvarı, 23-27 Ağustos, Gebze,
KOCAELİ.
4. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi. 4-10 Eylül 2011. Kars.
5. Kan Parazitlerinin teşhisinde LAMP yönteminin kullanılması
çalıştayı. 6 Eylül 2011, Kars.

6. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Fırat Üniversitesi, 2008.
7. Moleküler Biyoloji Yöntemleri Uygulama Eğitimi Sertifikası, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Marmara Araştırma Merkezi (MAM), TÜBİTAK, 2010.
8. Ixodid Keneler ve Naklettikleri Hastalıklar, Doktora semineri (Danışman: Prof. Dr. Nazir Dumanlı), Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Programı, Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ, 2008.

YAYINLAR

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

1. Altay K, Aktas M, Dumanli N, **Aydin MF**. Evaluation of a PCR and comparison with RLB for detection and differentiation of *Theileria* sp. MK and other *Theileria* and *Babesia* species of small ruminants. Parasitol Res 2008; 103(2): 319-323.
2. Altay K, **Aydin MF**, Dumanli N, Aktas M. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. Vet Parasitol 2008; 158(4): 295-301.
3. Aktas M, Vatansever Z, Altay K, **Aydin MF**, Dumanli N. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from Turkey. Trans R Soc Trop Med Hyg 2010; 104(1): 10-15.
4. **Aydin MF**, Aktas M, Dumanli N. Tick Infestations on Sheep and Goats in the Black Sea Region of Türkiye. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012; (baskıda).

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

1. Altay K, **Aydin MF**, Uluisik U, Aktas M, Dumanli N. *Theileria annulata* ve *Theileria buffeli*'nin Teşhisinde Multiplex PCR'ın Kullanılması. Türkiye Parazitolojisi Dergisi 2008; 32(1): 1-3.
2. **Aydin MF**, Balkaya I, Aktas M, Dumanli N. Erzurum İlinde Üç Kırmızı Tilkide (*Vulpes vulpes*) Kene (*Ixodoidea*) ve Pire (*Siphonaptera*) Türleri. Türkiye Parazitolojisi Dergisi 2011; 35(2): 110-113.

Uluslararası kongre, konferans ve sempozyumlardaki tebliğler

1. Uluisik U, **Aydin MF**, Altay K, Aktas M, Dumanli N. Diagnosis of *Theileria annulata* and *Theileria buffeli* with multiplex PCR. 9. International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress. 10-12. May. 2007. Ist. Turkey. p: 36-37.
2. Aktas M, Altay K, **Aydin MF**, Dumanli N. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle in the East Black Sea Region of Turkey. VI International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens. 21-26. Sep. 2008. Buenos Aires, Argentina. p: 209.
3. Aktas M, Altay K, **Aydin MF**, Dumanli N. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from Turkey. X International Jena Symposium on Tick-borne Diseases. 19-21 March 2009. Weimar, Germany. p: 161.
4. **Aydin MF**, Altay K, Aktas M, Dumanli N. Molecular epidemiology of theileriosis and babesiosis in sheep and goats in the Black Sea

region of Turkey. Seventh Ticks and Tick-borne Pathogens International Conference. 28 August-02 September 2011. Zaragoza, Spain.

Ulusal kongre, konferans ve sempozyumlardaki tebliğler

1. Özel S, Berilgen MS, Özbey Ü, Seyran A, Erişir M, Bulut S, Aktaş M, **Aydın MF**, Özler Z. Migren olgularında atak ve atak dışı dönemde kan antioksidan enzim düzeyleri ve genotip ilişkisi. 44. Ulusal Nöroloji Kongresi. 11–16 Kasım 2008. Antalya. s: 99.
2. **Aydın MF**, Balkaya İ, Aktaş M, Dumanlı N. Erzurum İlinde Kırmızı Tilkilerde (*Vulpes vulpes*) Belirlenen Kene (*Ixodoidea*) ve Pire (*Siphonaptera*) Türleri. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi. 1-6 Kasım 2009. Adana. s: 265-266.
3. Şahin İH, **Aydın MF**, Balank M. Bitlis İlinde 1998-2008 Yılları Arasında Sıtma Epidemiyolojisi. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi. 1-6 Kasım 2009. Adana. s: 304.
4. **Aydın MF**, Aktaş M, Dumanlı N. Karadeniz Bölgesinde Koyun ve Keçilerde Kene Enfestasyonları. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 4-10 Eylül 2011. Kars. s: 169.
5. Özşensoy Y, Önen C, **Aydın MF**, Şahin Z. Bitlis Eren Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik Öğrencilerinin Domuz Gribi Hakkında Bilgi Düzeyleri ve Tutumlarının Değerlendirilmesi, 14. Ulusal Halk Sağlığı Kongresi, 4-7 Ekim 2011, Trabzon.