

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

ŞANLIURFA YÖRESİNDE KOYUN VE KEÇİLERDE
***ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*'UN**
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MÜZEYYEN ATAŞ
ELAZIĞ-2015

ONAY SAYFASI

Prof.Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof.Dr. Ergün KÖROĞLU

Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Nazir DUMANLI

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Nazir DUMANLI

Prof. Dr. Munir AKTAŞ

Doç. Dr. İbrahim BALKAYA

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca beni yönlendiren değerli hocam Doç. Dr. Kürşat ALTAY'a, danışman hocam Prof. Dr. Nazir DUMANLI'ya, laboratuvar aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Parazitoloji Anabilim Dalında görev yapan bütün hocalarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	3
4. GEREÇ VE YÖNTEM	10
4.1. Kan Örneklerinin Toplanması.....	10
4.2. DNA İzolasyonu.....	12
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	13
4.4. DNA Dizi Analizi.....	15
5. BULGULAR	16
6. TARTIŞMA.....	20
7. KAYNAKLAR	25
8. ÖZGEÇMİŞ.....	29

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. <i>Anaplasma</i> soyunda bulunan önemli türler ile bu türlerin oluşturdukları hastalıklar, yerleştiği hücre, konakları ve vektörleri.	4
Tablo 2. Çalışmanın yürütüldüğü odaklar ile bu odaklarda koyun ve keçilerden toplanan örnek sayıları.	11
Tablo 3. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan <i>Anaplasma phagocytophilum</i> –spesifik primerler.	13
Tablo 4. Şanlıurfa yöresinde koyun ve keçilerden alınan örneklerin PZR sonuçları.	16

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1:** *Anaplasma phagocytophilum* yönünden incelen kan örneklerinin toplandığı merkezler. 10
- Şekil 2:** PZR jel görünümü. M: Marker (100 bp), 1: Negatif kontrol DNA, 2: Pozitif kontrol, 3: Negatif örnek, 4: Pozitif örnek. 17
- Şekil 3:** Genbank'ta yayınlanan sekans örneğinin (KJ183079) görünümü. 18
- Şekil 4:** Dizi analizi yaptırılan örneğin (KJ183079) yayınlanmış sekans sonuçları (KF459965 ve KJ782386) ile kıyaslanması (alignment). 19

1. ÖZET

Anaplasma phagocytophilum ruminant, kemirici, tek tırnaklı, kuş ve insanlarda granülositik anaplasmosise neden olan ve kenelerle nakledilen bir türdür. Bu araştırma, Şanlıurfa yöresinde koyun ve keçilerde *A. phagocytophilum*'un varlığı ve yaygınlığının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Nisan-Temmuz 2013 tarihleri arasında koyun ve keçilerden alınan kan örneklerinde etkenin varlığı 16S SSU rRNA genine spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak araştırılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu pozitif örnekleri temsilen seçilen bir örneğin 16S SSU rRNA geninin DNA dizilimi belirlenmiştir.

Şanlıurfa yöresinde 134 koyun ve 74 keçi olmak üzere 208 hayvandan tam kan örneği alınmıştır. Laboratuvarında elde edilen total genomik DNA'lar *A. phagocytophilum*'un 16S SSU rRNA genini kısmi olarak amplifiye edenspesifik primerler ile PZR'ye tabi tutulmuştur.

Bu çalışmada incelenen 208 kan örneğinin 9 (% 4.33)'unda *A. phagocytophilum*'un varlığını gösteren amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. *A. phagocytophilum* pozitiflik oranının koyunlarda % 5.97 (8/134), keçilerde % 1.35 (1/74) olduğu saptanmıştır. Bir örneğin DNA dizi analizi belirlenmiş ve GenBank'a KJ183079 accession numarası ile kayıt edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile Şanlıurfa yöresindeki koyun ve keçilerde PZR ve sekans analizi ile *A. phagocytophilum* varlığı ilk defa ortaya konmuş ve etkene ait epidemiyolojik veriler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Anaplasma phagocytophilum*, PZR, koyun, keçi, Şanlıurfa.

2. ABSTRACT

AN INVESTIGATION OF ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM ON GOATS AND SHEEPS WITH MOLECULAR METHODS IN SANLIURFA REGION

Anaplasma phagocytophilum are tick born rickettsial organism and they cause granulocytic anaplasmosis in ruminants, equids, birds and humans. This study was performed to determine the presence and prevalence of *A. phagocytophilum* in sheep and goats in the Şanlıurfa region between April and July 2013. Polymerase chain reaction (PCR) using primers specific to the *A. phagocytophilum* 16S SSU rRNA gene of the bacterium was applied to blood samples. The amplified DNA fragments in PCR positive samples were sequenced in order to confirm their identity.

Whole blood samples were taken from a total of 208 animals (134 sheep and 74 goats) in the Şanlıurfa region. The total genomic DNA was extracted in the laboratory and a part of the 16S SSU rRNA gene of *A. phagocytophilum* was PCR-amplified using the species-specific primers.

PCR amplification indicated the presence of *A. phagocytophilum* in 9 animals (4.33 %). *A. phagocytophilum* was present in 5.97 % (8/134) of sheep and 1.35 % (1/74) of goats. The nucleotide sequence of a sample selected to represent the PCR positive samples was determined. The resulting DNA sequence was compared to other DNA sequences available in the GenBank using BLAST analysis and placed into GenBank under accession number as KJ183079.

As a result, presence of *A. phagocytophilum* in the sheep and goats in the Şanlıurfa region was demonstrated for the first time using PCR and sequence analyses and epidemiologic data regarding the pathogen were also obtained.

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*, PCR, sheep, goat, Şanlıurfa.

3. GİRİŞ

Anaplasmosis, Rickettsiales dizisi, Anaplasmataceae ailesinde yer alan *Anaplasma* soyuna bağlı türlerin neden olduğu, tropik ve subtropik bölgelerde evcil ve yabani hayvanlarda yaygın olarak görülen enfeksiyöz bir hastalıktır. Hastalık hem hayvan yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olmakta ve hem de insan sağlığını etkilemektedir. Anaplasmosis, kenelerle nakledilen bir enfeksiyondur. Bazı kan emici sineklerin çeşitli *Anaplasma* türlerini mekanik olarak nakledebildiği ve kanla kontamine olmuş enjektör ve benzeri tıbbi malzemelerle de hastalığın naklinin gerçekleşebileceği kaydedilmiştir (1-5).

Anaplasma türleri uzun yıllar protozoon olarak kabul edilmiş olmasına rağmen günümüzde Monera aleminin içerisinde aşağıdaki şekilde sınıflandırılır (1, 4).

Alem: Monera

Alt Alem: Bacteria

Kök: Proteobacteria

Sınıf: Alphaproteobacteria

Dizi: Rickettsiales

Aile: Anaplasmataceae

Soy: *Anaplasma*

Anaplasma soyuna bağlı önemli türler *A. marginale*, *A. centrale*, *A. bovis* (*Ehrlichia bovis*), *A. phagocytophilum* (*Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi*, HGE etkeni) *A. ovis* ve *A. platys* (*E. platys*)'tir. *A. marginale*, *A. centrale* sığır ve develerde, *A. ovis* koyunlarda, *A. phagocytophilum* ruminat, tek tırnaklı, kuş,

kemirici ve insanlarda ve *A. platys* (*E. platys*) ise köpeklerde enfeksiyona neden olan *Anaplasma* türleridir (6).

Anaplasma türleri konaklarında farklı hücreleri enfekte ederler. *A. marginale*, *A. centrale* ve *A. ovis* eritrositlere, *A. bovis* monositlere, *A. platys* trombositlere, *A. phagocytophilum* ise nötrofil ve eozinofillere yerleşir. *Anaplasma* soyuna bağlı türlerin, oluşturdukları hastalık, yerleştiği hücre, konak ve vektör bilgileri Tablo 1’de verilmiştir (7).

Tablo 1. *Anaplasma* soyunda bulunan önemli türler ile bu türlerin oluşturdukları hastalıklar, yerleştiği hücre, konakları ve vektörleri.

Türler	Hastalık	Yerleştiği Hücre	Konak	Vektör
<i>A. marginale</i>	Anaplasmosis	Eritrosit	Sığır, deve	<i>Boophilus</i> , <i>Dermacentor</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Ornithodoros</i> , <i>Tabanidae</i>
<i>A. centrale</i>	Anaplasmosis	Eritrosit	Sığır, deve	<i>Boophilus</i> , <i>Dermacentor</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Ornithodoros</i> , <i>Tabanidae</i>
<i>A. bovis</i> (<i>E. bovis</i>)	Monositik anaplasmosis, Nopel	Monosit, lenfosit	Sığır	<i>Amblyomma</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Hyalomma</i>
<i>A. phagocytophilum</i> (<i>E. phagocytophyllum</i>)	Granulositik anaplasmosis	Nötrofil, eozinofil	Ruminantlar, kemiriciler, tektürlükliler, kuşlar, insan	<i>Ixodes</i>
<i>A. ovis</i>	Anaplasmosis	Eritrosit	Koyun, keçi, geyik	<i>Boophilus</i> , <i>Dermacentor</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Ornithodoros</i> , <i>Tabanidae</i>
<i>A. platys</i> (<i>E. platys</i>)	Köpeklerin trombositopenisi	Trombosit	Köpek giller	<i>R. sanguineus</i>

Koyun ve keçilerde anaplasmosise neden olan türlerden *A. ovis*, son konakta eritrositlere, *A. phagocytophilum* ise nötrofil, eozinofil ve monositlere yerleşir (8,9). *A. ovis*, eritrositler içerisinde 0.1-0.2 µm büyüklüğünde ve bir parazitofor vakuol içerisinde yer alır (10). *A. phagocytophilum*, granülositik hücrelerdeki vakuoller içerisinde makro koloniler (morula safhası) halinde bulunur. Hücre içi vakuollerin çapı 6 µm, makro kolonilerin çapı ise 1.5 µm'ye kadar ulaşabilir. Koloniler polimorf, genellikle küresel ve elipsoidal yapıdadır. Etkenler küçük ve yoğun cisimcikler şeklinde bulunurken, bazı etkenler daha büyük ve dağınık bir ağ şeklinde görülebilir (reticulate body). Hücreler içerisindeki etkenler ikiye bölünerek çoğalırlar (11).

Anaplasma türlerinin biyolojisi vektör kene ve son konak omurgalı hayvanlar arasında geçer. Kenelerle hastalığın nakli biyolojik nakil şeklinde gerçekleşir. Keneler enfekte hayvandan kan emme esnasında kan ile birlikte etkenleri de alırlar. Etkenler ilk olarak kenenin bağırsak epitel hücrelerine girer ve burada ilk üreme dönemini geçirir. Etkenlerin sekonder üreme dönemleri ise kenenin tükürük bezlerinde meydana gelir. Burada çoğalan etkenler, kenelerin duyarlı bir konakta kan emmesi esnasında duyarlı konağa nakledilir. *A. ovis*'in sahada naklinden sorumlu yaygın kene türleri, *Rhipicephalus bursa*, *R. turanicus*, *Dermacentor silvarum*, *D. marginatus*, *D. andersoni* ve *Haemaphysalis sulcata*'dır (12). *A. phagocytophilum*'da başta *Ixodes* soyuna bağlı türler olmak üzere Ixodid kenelerle nakledilirler. Ancak *A. phagocytophilum*'un farklı kıtalarda farklı kene türleri ile nakledildiği, buna göre Avrupa'da *Ixodes ricinus*'un, Amerika'da ise *I. scapularis* ve *I. pasificus* türlerinin etkenin vektörlüğünü yaptığı belirtilmiştir (13,14). Etken ayrıca *I. persulcatus*, *I. trianguliceps* ve

Haemaphysalis punctata'da tespit edilmiştir (15). *A. phagocytophilum*'un naklinin transtadial olarak gerçekleştiği, transovarial yolla nakledildiğine dair bir bilginin bulunmadığı ifade edilmiştir (12).

Koyun ve keçilerde anaplasmosisin patogenezi ve oluşan enfeksiyonun şiddetini belirleyen ön önemli kriter enfeksiyona neden olan *Anaplasma* türüdür. Koyun ve keçilerde anaplasmosisin primer etkeni *Anaplasma ovis*'tir (12). *A. ovis* enfeksiyonları genellikle hafif seyirlidir. Bununla birlikte *A. ovis*'in koyun ve keçilerde sekonder enfeksiyonlar için predispozisyona yol açtığı kaydedilmiştir (16,17). Diğer taraftan klinik enfeksiyonlarda bildirilmiş, bu durumun ise genellikle sekonder enfeksiyonların varlığında ortaya çıktığı ifade edilmiştir (18). Klinik *A. ovis* enfeksiyonları progressive bir anemi ile karakterize olup, buna kaşeksi ve ölüm eşlik eder. Anemi temelde hemorajik niteliktedir (19).

Anaplasma phagocytophilum ilk olarak 1940 yılında tanımlanmış ve o tarihte *Rickettsia phagocytophila* olarak isimlendirilmiştir. 1960'lı yıllarda ise etkene granulositik hücrelere yerleşmesi ve *Cytoecetes microti*'ye olan morfolojik benzerliği nedeniyle *Cytoecetes phagocytophila* adı verilmiştir. Aynı yıllarda Kaliforniya'da atlarda tespit edilen granulositik ehrlichiosis etkeni ise ayrı bir tür kabul edilmiş ve *Ehrlichia equi* olarak tanımlanmıştır (11). 1980'li yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde insan granulositik ehrlichiosis (HGA) vakaları tespit edilmiş (20), benzer insan granulositik vakaları izleyen yıllarda Avrupa'da da ortaya çıkmıştır (21). Ribosomal RNA genlerinin sekans homolojilerine göre 2001 yılında yeniden yapılan sınıflandırmada ruminant, at ve insanlardaki granulositik ehrlichiosis etkenlerinin aynı türün farklı varyantları olduğu ifade edilmiştir (1). Günümüzde koyun, keçi, sığır, at, kedi, köpek gibi hayvanlar ve

insanlarda granulositik ehrlichiosis etkeninin *Anaplasma phagocytophilum* olduğu kabul edilmektedir (11,22). *A. phagocytophilum*'un neden olduğu enfeksiyon insanlarda human granulositik ehrlichiosis/anaplasmosis (HGE/HGA), hayvanlarda tick borne fever (TBF), sığırlardaki hastalık ise pasture fever (mera humması) olarak isimlendirilir (12).

Anaplasma phagocytophilum enfeksiyonlarının patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Kenenin konağa etkenleri nakletmesinden sonraki 4-7 günlük sürede meydana gelen primer replikasyon döneminin nasıl gerçekleştiği belirgin değildir. Hatta duyarlı hayvanlara enfekte kan inokülasyonundan sonraki 72-96 saatlerde etkenler kanda tespit edilememiştir. Bu durum etkenlerin, enfeksiyonun ilk döneminde kanda belirlenemeyecek seviyede bulunduğunu ya da diğer bazı hücrelerde çoğaldığını düşündürmüştür. Hastalığın inkübasyon süresi koyunlarda 4-8 gün arasındadır. Bunu 7 gün süre ile 41°C'nin üzerinde erken ateş takip eder. *A. phagocytophilum* enfeksiyonlarında immünsüpresyon, pnömoni, septisemi, artrit ve sekonder enfeksiyonlar görülür (11,23). Kanda belirgin bir lenfopeni ortaya çıkar. Bu tablo lenfositopeni ile başlar, buna ilaveten nötropeni ve trombositopeni şekillenir (24). Kandaki nötrofillerin % 95'i enfekte olabilir. *A. phagocytophilum* koyunlarda 42°C nin üstünde ateş, 1-2 haftaya kadar süren nötropeni, öksürük, iştahsızlık ve yorgunluğa neden olur. Süt üretimi azalır ve kilo kaybı şekillenir. İki haftalıktan küçük kuzularda semptomlar daha şiddetli olarak ortaya çıkar. *A. phagocytophilum* enfeksiyonları, sekonder enfeksiyonlar oluşmadığında nadiren ölümle sonuçlanır (12). Bu enfeksiyonları atlatan koyunlarda persite enfeksiyonlar şekillenir. Etkenler koyunlarda aylarca hatta yıllarca bulunur, bu açıdan koyunlar önemli bir enfeksiyon kaynağıdır (15). *A.*

phagocytophilum enfeksiyonlarının keçilerde yüksek ateş ve süt üretiminde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (12,15).

Enfeksiyon gebe koyunlarda abortlara yol açarken, koçlarda en az iki ay süreyle spermatogenezisi olumsuz etkiler. Koyunlarda *A. phagocytophilum* enfeksiyonlarının en önemli etkisi, diğer enfeksiyonlara karşı neden olduğu predispozisyonudur. Özellikle lenfopeni ve bakteriyemi dönemlerinde koyunlar sekonder viral ve bakteriyel enfeksiyonlara daha duyarlıdır. Enfeksiyon süresince oluşan immun yetersizliğin mekanizmaları henüz açıklık kazanmamıştır. Ancak enfekte hayvanlarda en az altı hafta süreli bir immunsüpresyon şekillenir. Bu durumun, enfeksiyon sürecinde oluşan lenfopeni ile ilgili olduğu ileri sürülmüştür (12,15).

Anaplasma phagocytophilum'un neden olduğu akut enfeksiyonların teşhisi, klinik bulgular ve Giemsa ile boyalı preparatlarda eosinofiller içerisindeki etkenlerin görülmesiyle yapılır (9,25). Akut enfeksiyonu atlatan hayvanlar portör duruma geçer ve bu konaklar enfeksiyon kaynağı olarak hizmet görür (15). Mikroskopik muayene ile etkenlerin her zaman perifer kanda tespit edilememesi, populasyon içindeki portör hayvanların belirlenmesini zorlaştırır. Bu durum ise daha duyarlı teşhis metotlarının kullanılmasını zorunlu kılan faktörlerin başında gelir. Serolojik metotlar mikroskopik muayeneye göre daha duyarlıdır. Fakat serolojik metotların da, türler arasında çapraz reaksiyonların görülebilmesi, spesifik immun yanıtların zayıf olabilmesi ve uzun süreli taşıyıcılık durumunda antikorların her zaman tespit edilememesi gibi olumsuzlukları söz konusudur (25). Son yıllarda paraziter hastalıkların teşhisinde, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip moleküler metotlar kullanılmaya başlanmıştır. Hedef DNA parçasının in

vitro ortamda çoğaltılması prensibi ile çalışan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) bu teşhis metotlarının başında gelir. PZR ile çok sayıda kan parazitinin de yüksek duyarlılık ve özgüllükte teşhisi sağlanmıştır (26-29). *A. phagocytophilum* spesifik PZR metodu, etkenin epidemiyolojisini belirlemeye yönelik çalışmalarda da kullanılmaktadır (27,30).

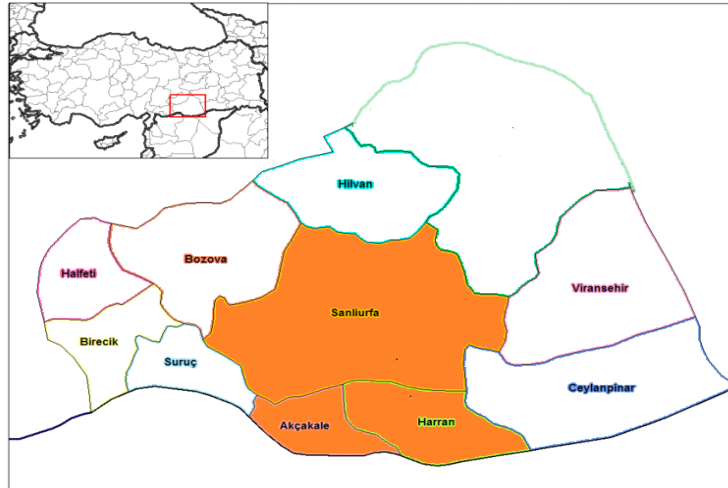
Anaplasma phagocytophilum'un koyun ve keçilerdeki varlığı mikroskopik, serolojik ve moleküler metotların kullanıldığı çalışmalarla dünyanın birçok ülkesinde ortaya konulmuştur (27,31-36). Türkiye'de *A. phagocytophilum*'un varlığı ve yaygınlığı üzerine sınırlı sayıda çalışma yapılmış, moleküler yöntemlerle koyun, keçi ve sığırlar ile bazı kene türlerinde etkenin varlığı belirlenmiştir (26,27,32,37). Koyun ve keçi popülasyonunun yüksek olduğu Şanlıurfa yöresinde *A. phagocytophilum* ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma zoonotik potansiyeli de bulunan *A. phagocytophilum*'un Şanlıurfa yöresindeki koyun ve keçilerde varlığı ve yaygınlığının moleküler yöntemlerle ortaya konması amacıyla yapılmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Şanlıurfa yöresinde koyun ve keçilerde *A. phagocytophilum*'un varlığı ve yayılışının belirlenmesi amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla; Şanlıurfa merkez ile Akçakale ve Harran ilçelerinde toplam 208 koyun ve keçiden EDTA'lı kan örneği alınmış, örneklerden total DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA örnekleri *A. phagocytophilum* varlığı yönünden polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutulmuş, pozitif olduğu tespit edilen örneklerden birinde DNA dizi analizi gerçekleştirilmiş, elde edilen DNA dizisi BLAST ile analiz edilmiş ve bu sekans GenBank'a kayıt edilmiştir.

4.1. Kan Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmada kullanılan kan örnekleri Nisan-Temmuz 2013 tarihleri arasında Şanlıurfa merkez, Akçakale ve Harran ilçeleri ve bu odaklara bağlı köylerdeki koyun ve keçilerden alınmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. *Anaplasma phagocytophilum* yönünden incelen kan örneklerinin toplandığı merkezler.

Mayıs 2010-Eylül 2011 tarihleri arasında adı geçen merkezlere gidilerek, her merkezde farklı odaklar belirlenmiş ve bu odaklardaki sürülerden rastgele seçilen koyun ve keçilerden EDTA'lı tüplere 3'er ml kan alınmıştır.

Örneklemede, sürünün büyüklüğüne göre her sürüden 3-15 hayvan rastgele seçilmiş ve bunların en az bir hastalık sezonu (Nisan-Eylül ayları arası) geçirmiş olmalarına dikkat edilmiştir. EDTA'lı kanlar, +4°C'yi sağlayan termosta muhafaza edilmiştir. Soğuk zincirde laboratuvara getirilen kan örnekleri DNA izolasyonunda kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Saha çalışmaları sonucunda Şanlıurfa'dan toplam 208 hayvandan kanörneği alınmıştır. Bunların 134'ünü koyunlardan [Şanlıurfa Merkez (n=33), Akçakale (n=57), Harran (n=44)], 74'ünü keçilerden [Şanlıurfa Merkez (n=30), Akçakale (n=26), Harran (n=18)] alınan örnekler oluşturmuştur. Çalışmanın yürütüldüğü merkezler ile bu merkezlerden elde edilen örnek sayıları ve odaklara göre dağılımı Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmanın yürütüldüğü odaklar ile bu odaklarda koyun ve keçilerden toplanan örnek sayıları.

Odak	Koyun	Keçi	Toplam
Şanlıurfa Merkez	33	30	63
Akçakale	57	26	83
Harran	44	18	62
Toplam	134	74	208

4.2. DNA İzolasyonu

Elde edilen örneklerden ticari DNA izolasyon kiti ile (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Fermentas, K0722), aşağıdaki protokole göre total DNA izolasyonu yapılmıştır.

1. Steril ependorf tüplere 200 µl kan örneği alınmış, üzerine 400 µl lizis solüsyonu ve 20 µl Proteinaz-K eklenmiş, vorteksleyerek homojen bir karışım elde edilmiştir.

2. Karışım 56°C'deki çalkalayıcı su banyosunda her 15 dakikada bir vortekslenerek bir saat boyunca inkübe edilmiştir.

3. Inkübasyon sonrası örnek üzerine 200 µl etanol ilave edilip vortekslenmiştir.

4. Örnek lizatı, toplama tüpüne yerleştirilmiş olan GeneJET DNA Purification kolonuna aktarılıp, 6000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Takiben toplama tüpü atılmış, kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

5. Kolon'a 500 µl Wash Buffer I eklenerek, 8000 g'de 1 dk santrifüj edilmiş, tüpte biriken sıvı atılarak kolon tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

6. Kolon'a 500 µl Wash Buffer II eklenerek, maksimum hızda 3 dk santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atılıp, kolon steril bir ependorf tüp içine yerleştirilmiştir.

7. Kolon'a 200 µl Elution Buffer eklenerek oda ısısında 2 dk inkübasyondan sonra 8.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

8. Kolon atılmış, eppendorf tüpte kalan DNA örneği kullanılıncaya kadar 20°C'de saklanmıştır.

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Koyun ve keçilerden alınan kanlardan izole edilen genomik DNA örnekleri, *A. phagocytophilum*'un varlığı yönünden PZR ile çoğaltma işlemine tabi tutulmuştur. Bu çalışmada kullanılan, *A. phagocytophilum* primerleri ile bunlara ait nükleotid dizilimleri, çoğaltılan gen ile bu bölgenin uzunluğu ve primerlerin ilk defa kullanıldığı kaynak Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan *Anaplasma phagocytophilum*–spesifik primerler.

Primer Adı	Gen Bölgesi	Nükleotid Dizilimi (5'-3')	Ürün Büyüklüğü (bp)	Kaynak
SSAP2F	16S SSU	GCTGAATGTGGGGATAATTTAT		
SSAP2R	rRNA	ATGGCTGCTTCCTTTCGGTTA	641	Kawahara ve ark., 2006

DNA örneklerinin, *A. phagocytophilum* yönünden incelenmesinde, etkenin 16S SSU rRNA genine spesifik primerler kullanılarak PZR yapılmıştır. Bu primerlerin, daha önce yapılan başka bir araştırmada *A. phagocytophilum*'u spesifik olarak çoğalttığı bildirilmiştir (30).

Polimeraz zincir reaksiyonu MJ Minicycler (England) cihazında gerçekleştirilmiştir. Toplam 50 µl hacimde hazırlanan PZR karışımına, 125 µM dNTP miks, 1.25 IU Taq-DNA polimeraz enzimi, 5 mM MgCl₂, 10X PCR Buffer (750 mM Tris-HCl (pH 8,8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, % 0.1 Tween 20), 2.5 µl (20 pmol/µl) primerlerin her birinden ve hedef DNA'dan (template) 5 µl ilave

edilmiştir.

Anaplasma phagocytophilum-spesifik PZR 36 siklus olarak gerçekleştirilmiş ve her siklus 94°C’de 1 dk denaturasyon, 56 °C’de 1 dk hibridizasyon ve 72°C’de 1 dk sentez aşamalarından oluşmuştur. Reaksiyona 94 °C’de 5 dk ön denaturasyon ve 72°C’de 10 dk son uzama ilave edilmiştir. PZR’da elde edilen ürünler agaroz jel elektroforeze tabi tutulmuştur. Buna göre %1.5’lik agaroz jel hazırlandıktan sonra, 20 µl PZR ürünü, 5 µl yükleme solüsyonu (Loading Dye) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez işlemi Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tampon solüsyonu kullanılarak jel tankında 90 voltta 1 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra jel, ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dk boyanıp, UV transillüminatörde spesifik bantların varlığı yönünden incelenmiştir. Metodun herhangi bir aşamasında oluşabilecek muhtemel kontaminasyonları belirlemek için, hem DNA izolasyonu hem de PZR aşamasında pozitif ve negatif kontroller kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan *A. phagocytophilum* pozitif kan örneği, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında daha önce yapılan bir çalışmada DNA dizi analizi ile teyit edilmiştir (GenBankası, JF807995) (27).

Negatif kontrol DNA örneği elde etmek için, bir aylık kuzudan kan alınmış ve bu kandan yukarıda belirtildiği şekilde DNA izole edilmiştir. Bu DNA, bütün *Anaplasma* ve *Ehrlichia* türlerinin 16S SSU rRNA geninin 492-498 bp’lik kısmını amplifiye ettiği ifade edilen 16S8FE (5’-GGAATTCAGAGTTGGATCATGGCTCAG-3’) ve BGA1B (5’-CGGGATCCCGAGTTTG CCGGGACTTCTTCT-3’) primerleri ile PZR’de amplifikasyona tabi tutulmuştur (39,40). Reaksiyon sonucunda,

Anaplasmatürlerinin varlığını gösterecek herhangi bir amplifikasyon ürünü oluşmamıştır. Böylece bu örneğin, *Anaplasma* türleri yönünden ari olduğu kabul edilmiş ve bu çalışma süresince gerek DNA izolasyonunda ve gerekse PZR testinde negatif kontrol DNA örneği olarak kullanılmıştır.

4.4. DNA Dizi Analizi

PZR sonucunda pozitif olduğu belirlenen örnekleri temsilen seçilen bir amplifikasyon ürününün DNA dizisi belirlenmiştir. İlk olarak DNA dizisi belirlenecek örneğin 16S SSU rRNA gen kısmı bölgesi SSAP2F ve SSAP2R primerleri ile PZR’de tekrar çoğaltılmıştır. Bu örnek % 1.6’lık agaroz jelde elektroforeze tabi tutulduktan sonra hedef bölge kesilerek jelden ayrılmış ve ticari kit (Wizard, PCR Clean-up system, Promega, A.B.D) kullanılarak purifiye edilmiştir. Purifiye DNA örneğinin sekans belirleme reaksiyonu ticari bir firmaya yaptırılmıştır (İontek, İstanbul, Türkiye).

Bu çalışmada Şanlıurfa yöresinde elde edilen DNA diziliminin daha önce GenBankasına kaydı yapılmış DNA dizilimleri ile karşılaştırılması BLAST analizi ile yapılmıştır (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Son olarak, DNA dizilimleri GenBank’a (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank>) sunularak kabul numarası alınmıştır.

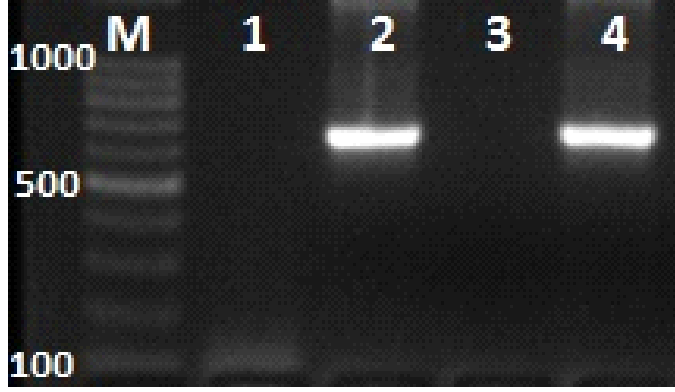
5. BULGULAR

Koyun ve keçilerden alınan kan örneklerine ait PZR sonuçları Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4.Şanlıurfa yöresinde koyun ve keçilerden alınan örneklerin PZR sonuçları.

Odak	Koyun			Keçi			Toplam		
	n	+	%	n	+	%	n	+	%
Merkez	33	1	3.03	30	0	0	63	1	1.59
Akçakale	57	5	8.77	26	0	0	83	5	6.02
Harran	44	2	4.54	18	1	5.55	62	3	4.84
Toplam	134	8	5.97	74	1	1.35	208	9	4.33

Tablo 4’de de görüldüğü gibi Şanlıurfa yöresinden 134’ü koyun ve 74’ü keçi olmak üzere toplam 208 kan örneği incelenmiş, bu örneklerin 9’unda (% 4.33) *A. phagocytophilum* spesifik PZR pozitiflik tespit edilmiştir (Şekil 2). Koyunlara ait 134 örneğin 8’inde (% 5.97), keçilere ait 74 örneğin 1’inde (% 1.35) *A. phagocytophilum* spesifik PZR pozitiflik saptanmıştır. İncelenen örneklerden 63’ü Şanlıurfa il merkezi, 83’ü Akçakale ve 62’si Harran ilçelerindeki koyun ve keçilerden alınmıştır. İl merkezindeki örneklerin % 1.59’unda (1/63), Akçakale ilçesindeki örneklerin % 6.02’sinde (5/83), Harran ilçesindeki örneklerin ise % 4.84’ünde (3/62) *A. phagocytophilum* spesifik PZR pozitiflik belirlenmiştir.



Şekil 2: PZR jel görünümü. M: Marker (100 bç), 1: Negatif kontrol DNA, 2: Pozitif kontrol, 3: Negatif örnek, 4: Pozitif örnek.

Bu çalışmada Şanlıurfa yöresinde *A. phagocytophilum* yönünden PZR ile incelenen 208 koyun ve keçinin 9’unda pozitif amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. Bu örnekleri temsilen seçilen bir örneğin 16S SSU rRNA geni, DNA dizisi GenBank’ta kayıtlı diğer DNA dizilimleri ile karşılaştırılmıştır (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Daha sonra bu DNA dizisi GenBankasına kaydedilerek (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank>) kayıt numarası (Accession Number) alınmıştır (KJ183079) (Şekil 3).

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Advanced Search Help

Display Settings: GenBank Send to: Change region shown

Anaplasma phagocytophilum isolate UK 40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KJ183079.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to](#)

LOCUS KJ183079 575 bp DNA linear ENV 14-APR-2014

DEFINITION Anaplasma phagocytophilum isolate UK 40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION KJ183079

VERSION KJ183079.1 GI:608606204

KEYWORDS ENV.

SOURCE Anaplasma phagocytophilum

ORGANISM Anaplasma phagocytophilum

Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Anaplasmataceae; Anaplasma; phagocytophilum group.

REFERENCE 1 (bases 1 to 575)

AUTHORS Altay,K. and Bayram,H.

TITLE Detection of Anaplasma phagocytophilum in sheep from Sanliurfa in Turkey

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 575)

AUTHORS Altay,K. and Bayram,H.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-Jan-2014) Parasitology, Cumhuriyet University, Veterinary Medicine, Sivas, Sivas 58140, Turkey

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES

Location/Qualifiers

source

1..575

/organism="Anaplasma phagocytophilum"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="UK 40"

/host="sheep"

/db_xref="taxon:948"

/environmental_sample

/country="Turkey"

/note="Amplified with species-specific primers"

<1..575

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gcttggggac tacggtcgca agactaaac tcaagggaat tgacggggac cgcacaagc

61 ggtagagcat gtggtttaat tcgatgcaac gcgaataaac ttaccactcc ttgacatgga

121 gattagatcc ttcttaacgg aagggcgacg ttccgctgga ttctgcacag gtgctgcag

181 gctgtgctca gctgtgtctg tggatgtgtg ggttaagttc cgtacagagc gtaacacctca

241 tctttagttg cagcagaata atgcagggca tttaaggaa actgcgggtg gtaactgga

301 ggaaggtggg gatgatgca agtcagcagc gcccttatgg ggtggctac acacgtgcta

361 caatggtagc tacaataggt tgcattgtcg caagctgtag ctaatcctga aaagtcattc

421 cagttcgagat gtcctctctg aactcgaggg catgaagtcg gaatcgctag taactgtgga

481 tcagcatgcc acggtgaata cgtttctcgg tttgtacac actgccctgc acgccatggg

541 aattggctta actcgagct ggtcgctaa ccgaa

//

Recent activity

Turn Off Clear

Anaplasma phagocytophilum isolate UK 40 16S ribosomal RNA gene, partial seq Nucleotide

Anaplasma phagocytophilum isolate C130 16S ribosomal RNA gene, partial seq Nucleotide

Anaplasma phagocytophilum isolate ATS1 16S ribosomal RNA gene, partial seq Nucleotide

Nucleotide Sequence (575 letters) BLAST

Simsek S (112) Nucleotide

See more...

Şekil 3: Genbank'ta yayınlanan sekans örneğinin (KJ183079) görünümü.

Bu çalışmada elde edilen *A. phagocytophilum* 16S SSU rRNA kısmi sekansı, GenBank'ta mevcut diğer sekanslar ile karşılaştırıldığında *A. phagocytophilum* koyun izolatları ile (KJ782386, KJ782387) % 100 oranında benzerliğe sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Şekil 4).

				20				40				60	
KF459965	AT.....												16
KJ782386	GCTGAATGTG	GGGATAATTT	ATCTCCGTGT	TGTAGCTAAC	GCGTTA....								60
KJ183079													6
Consensus	NN.....												
				80				100				120	
KF459965	GGACTACGGT	CGCAAGACTA	AAACTCAAAG	GAATTGACGG	GGACCCGCAC	AAGCGGTGGA							76
KJ782386													120
KJ183079													68
Consensus	GGACTACGGT	CGCAAGACTA	AAACTCAAAG	GAATTGACGG	GGACCCGCAC	AAGCGGTGGA							
				140				160				180	
KF459965	GCATGTGGTT	TAATTCGATG	CAACGCGAAA	AACCTTACCA	CTCCTTGACA	TGGAGATTAG							136
KJ782386													180
KJ183079													126
Consensus	GCATGTGGTT	TAATTCGATG	CAACGCGAAA	AACCTTACCA	CTCCTTGACA	TGGAGATTAG							
				200				220				240	
KF459965	ATCCTTCTTA	ACGGAAGGGC	GCAGTTCGGC	TGGATCTCGC	ACAGGTGCTG	CATGGCTGTC							196
KJ782386													240
KJ183079													186
Consensus	ATCCTTCTTA	ACGGAAGGGC	GCAGTTCGGC	TGGATCTCGC	ACAGGTGCTG	CATGGCTGTC							
				260				280				300	
KF459965	GTCAGCTCGT	GTCGTGAGAT	GTTGGGTTAA	GTCCCGCAAC	GAGCGTAACC	CTCATCCTTA							256
KJ782386													300
KJ183079													246
Consensus	GTCAGCTCGT	GTCGTGAGAT	GTTGGGTTAA	GTCCCGCAAC	GAGCGTAACC	CTCATCCTTA							
				320				340				360	
KF459965	GTTGCCAGCG	GGTAATGCCG	GGCACTTTAA	GGAAACTGCC	GGTGGTAAAC	TGGAGGAAGG							316
KJ782386													360
KJ183079													306
Consensus	GTTGCCAGCG	GGTAATGCCG	GGCACTTTAA	GGAAACTGCC	GGTGGTAAAC	TGGAGGAAGG							
				380				400				420	
KF459965	TGGGGATGAT	GTCAAGTCAG	CACGGCCCTT	ATGGGGTGGG	CTACACACGT	GCTACAATGG							376
KJ782386													420
KJ183079													366
Consensus	TGGGGATGAT	GTCAAGTCAG	CACGGCCCTT	ATGGGGTGGG	CTACACACGT	GCTACAATGG							
				440				460				480	
KF459965	TGACTACAAT	AGGTTGCAAT	GTCGCAAGGC	TGAGCTAATC	CGTAAAAGTC	ATCTCAGTTC							436
KJ782386													480
KJ183079													426
Consensus	TGACTACAAT	AGGTTGCAAT	GTCGCAAGGC	TGAGCTAATC	CGTAAAAGTC	ATCTCAGTTC							
				500				520				540	
KF459965	GGATTGTCCT	CTGCAACTCG	AGGGCATGAA	GTCGGAATCG	CTAGTAATCG	TGGATCAGCA							496
KJ782386													540
KJ183079													486
Consensus	GGATTGTCCT	CTGCAACTCG	AGGGCATGAA	GTCGGAATCG	CTAGTAATCG	TGGATCAGCA							
				560				580				600	
KF459965	TGCCACGGTG	AATACGTTCT	CGGGTCTTGT	ACACACTGCC	CGTCACGCCA	TGGGAATTGG							556
KJ782386													600
KJ183079													546
Consensus	TGCCACGGTG	AATACGTTCT	CGGGTCTTGT	ACACACTGCC	CGTCACGCCA	TGGGAATTGG							
				620				640					
KF459965	CTTAACCTCGA	AGCTGGTGCG	CTAACC GAAG	AAAAA.....	.. 591								
KJ782386													
KJ183079													
Consensus	CTTAACCTCGA	AGCTGGTGCG	CTAACC GAAN	NNAAN.....	.. 575								

Şekil 4: Dizi analizi yaptırılan örneğin (KJ183079) yayınlanmış sekans sonuçları (KF459965 ve KJ782386) ile kıyaslanması (alignment).

6. TARTIŞMA

Keneler ve kenelerle nakledilen paraziter hastalıklar tüm dünyada yaygın olup, hayvan yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara yol açar (16,41,42). Theileriosis, babesiosis, anaplasmosis ve ehrlichiosis kenelerle nakledilen önemli ve yaygın hastalıklardır. Koyun ve keçilerde theileriosis etkenlerinin *Theileria lestoquardi*, *T. ovis*, *T. separata* ve yeni tespit edilen *T. uilenbergi* ve *T. luwenshuni* olduğu; bu türlerden, *T. lestoquardi*, *T. uilenbergi* ve *T. luwenshuni*'nin sığırlardaki *T. parva* ve *T. annulata* gibi yüksek morbidite ve mortaliteyle seyreden klinik; *T. ovis* ve *T. separata*'nın subklinik enfeksiyonlar oluşturduğu ifade edilmiştir (16,41-44). İlk olarak İspanya'da koyun ve keçilerde varlığı ortaya konulan *Theileria* sp. OT1 ve OT3 ile Türkiye'de belirlenen *Theileria* sp. MK'nın patojeniteleri hakkında fazla bilgiye rastlanmamıştır (45,46). Koyun ve keçilerde enfeksiyona neden olan *Babesia* türlerinin ise *B. ovis*, *B. motasi* ve *B. crassa* olduğu bildirilmiş; *B. ovis* ve *B. motasi*'nin patojen türler olup klinik enfeksiyonlara yol açtığı; *B. crassa*'nın ise apatojen bir tür olduğu saptanmıştır (16,41-44). *Anaplasma* soyuna bağlı önemli türler *A. marginale*, *A. centrale*, *A. bovis* (*Ehrlichia bovis*), *A. phagocytophilum* (*Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi*, HGE etkeni) ve *A. platys* (*E. platys*)'tir. *A. marginale*, *A. centrale* sığır ve develerde, *A. ovis* koyunlarda enfeksiyona neden olurlar. *A. phagocytophilum* ruminant, tek tırnaklı, kuş, kemirici ve insan da dahil geniş bir konakçı dağılımına sahiptir. *A. platys* ise köpeklerde enfeksiyon neden olan *Anaplasma* türüdür (6). Koyun ve keçilerde anaplasmosise neden olan tür *A. ovis* ve *A. phagocytophilum*'dur (8,9).

Türkiye’de evcil hayvanların kan protozoonları ile ilgili yürütülen çalışmaların büyük çoğunluğu theileriosis ve babesiosisle ilgilidir. Bu çalışmalarda; *T. lestoquardi* (45-51), *Theileria* sp. OT3 (45), *Theileria* sp. MK (45), *B. ovis*(45,49,52,53), *B. motasi* (54)ve *B. crassa* (55) türlerinin varlığı bildirilmiştir. Bu türlerden *T. lestoquardi* ve *B. motasi*’nin Türkiye’deki varlığı sadece mikroskopik bakı ile yapılan az sayıdaki çalışmada bildirilmiş (47,48,54), *T. lestoquardi* ile enfekte olduğu iddia edilen hayvanlardaki parazitemi oranı, şizontların varlığı ve diğer klinik bulgulardan bahsedilmemiştir (48). *B. crassa*’nın ise *Babesia* izolatlarının sekans analizine dayalı olarak yapılan bir çalışmada Türkiye’de tespit edildiği ileri sürülmüş ve AY260177 accession numarası ile gen bankasına kayıt edildiği görülmüştür (55). Bu kayıtlar dışında, son yıllarda serolojik ve moleküler yöntemlerle yapılan çalışmaların hiç birinde (45,49,56) adı geçen türlere rastlanmamıştır.

Kenelerle nakledilen hastalıkların bir bölgede varlığı ve yaygınlığı kene-konak-patojen zincirinin uygun bir çevrede etkileşimi ve tamamlanmasına bağlıdır. Bu etkileşimler doğrultusunda, hastalıkların prevalansı ülkeler arasında hatta aynı ülkenin coğrafi bölgeleri arasında önemli farklılıklar gösterir. Keneler ve konaklarının yaşadığı habitatlardaki değişiklikler, şehirleşme, ağaçsızlaştırma ya da yeniden ağaçlandırma, ormanlık alanlardaki toprakların kullanımı ve bölgeler arası hayvan nakilleri yukarıdaki döngüyü etkileyen önemli faktörlerdir. Ancak hastalığın bir bölgede varlığını direk etkileyecek en önemli faktör hastalığı nakledecek kene türünün bir bölgedeki varlığıdır. Kene türünün bölgedeki varlığı ve devamı, coğrafi bölgedeki iklim, iklim, habitat özellikleri, uygun konakların varlığı ve oranına bağlıdır (57). Türkiye’de kenelerle nakledilen

hastalıklara ilişkin epidemiyolojik çalışmalar; hastalığı nakleden kene türü/türlerinin görüldüğü bölgelerle, vektörlüğünü yaptıkları hastalıkların görüldüğü bölgelerin paralel olduğunu gösterir. *Ixodes* soyuna bağlı türler, Türkiye’de daha yoğun olarak Karadeniz, Ege ve Akdeniz bölgeleri gibi nemli ve ılıman iklim özelliklerinin hüküm sürdüğü ormanlık alanlarda bulunur (58-63). *A. phagocytophilum*’un başta *Ixodes* soyuna bağlı türler olmak üzere Ixodid kenelerle nakledildiği bilinmektedir (13,14). Karadeniz bölgesinde sığırılarda ve *I. ricinus*’ta *A. phagocytophilum* belirlenmiştir (37,38). Bununla birlikte, *A. phagocytophilum*’un dünyanın diğer bölgelerinde farklı Ixodid kene türlerinde tespit edilmiş olması, *Ixodes* türleri dışındaki kene türlerinin de bu patojeni nakledebileceğini gösterir (15,26). Nitekim Türkiye’de Doğu Anadolu Bölgesindeki koyun ve keçiler üzerinde yürütülen bir çalışmada *A. phagocytophilum* belirlenmiştir (27). Bu alışma ile Güneydoğu Anadolu Bölgesinde bulunan şanlıurfa ilindeki koyun ve keçilerde *A. phagocytophilum* varlığı araştırılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu ve sekans analizlerinin kullanıldığı bu çalışma sonucunda bölgede koyun ve keçilerde *A. phagocytophilum*’un varlığı ortaya konmuştur. Bu sonuç etkenin *Ixodes ricinus* dışında farklı kene türleri tarafından nakledilebileceği kanaatini doğurmuştur.

Anaplasma phagocytophilum’un koyun ve keçilerdeki varlığını belirlemeye yönelik çalışmalarda mikroskopik, serolojik ve son yıllarda moleküler metotların kullanıldığı görülmektedir (27,31-36). Mikroskopik muayenenin sensitivitesinin düşük olması ve serolojik testlerde çapraz reaksiyonların görülmesi, moleküler teşhis metotlarını ne çıkarmaktadır. Bu çalışmada da koyun ve keçilerden elde edilen kanlarda *A. phagocytophilum*’un araştırılmasında

polimeraz zincir reaksiyonu ve sekans analizi yöntemleri kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonunda SSAP2F ve SSAP2R primerleri kullanılarak etkenin 16S SSU rRNA geni spesifik olarak amplifiye edilmiştir. Ayrıca pozitif örnekleri temsilen seçilen bir örneğin sekans analiz yapılarak, *A. phagocytophilum* Şanlıurfa izolatının 16S SSU rRNA geninin kısmi DNA dizilimi belirlenmiştir. Elde edilen DNA diziliminin (KJ183079) BLAST analizi sonucunda Gen Bankasında kayıtlı koyunlara ait diğer *A. phagocytophilum* izolatlarıyla (KJ782386, KJ782387) % 100 benzerliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Böylece PZR ile tespit edilen *A. phagocytophilum* pozitifliklerinin doğruluğu ortaya konmuştur. Moleküler yöntemlerin kullanıldığı bu çalışma ile Şanlıurfa yöresinde *A. phagocytophilum*'un varlığı ilk kez tespit edilmiştir.

Anaplasma phagocytophilum'un koyun ve keçilerde prevalansını belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar, prevalansda coğrafi bölgeler arasında farklılıklar bulunmasına rağmen tüm dünyada görüldüğünü göstermektedir. Norveç'te koyunlarda etkenin seroprevalansı indirek floresan antikor testi (IFAT) ile % 30 olarak bulunmuştur (35). Aynı ülkede yine IFAT ile yürütülen başka bir çalışmada etkenin kuzulardaki seroprevalansı % 55 olarak tespit edilmiştir (33). İtalya'da IFAT ile yapılan bir seroprevalans çalışmasında incelenen koyunların % 13.3'ünde *A. phagocytophilum*'a karşı şekillenen antikorlar tespit edilmiştir (34). Çin'de koyun ve keçilerde real time PZR ile yapılan bir çalışmada incelenen koyunların % 7.1'inde ve keçilerin % 5.7'sinde *A. phagocytophilum* pozitifliği saptanmıştır (36). Slovakya'da koyun ve keçilerde *A. phagocytophilum*'un prevalansı PZR ile % 2.8 olarak tespit edilmiştir (31). Türkiye'de sınırlı sayıda da olsa koyun ve keçilerde *A. phagocytophilum*'un varlığı ve yaygınlığının

belirlendiği çalışmalar mevcuttur (27,32). Karadeniz bölgesinde koyunlarda *A. phagocytophilum* 'un prevalansı mikroskopik, serolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılmış, Artvin, Rize, Trabzon, Giresun, Ordu ve Samsun illerindeki 720 koyuna ait kan frotilerinin mikroskopik muayenesinde 71 frotide (% 9.86) *A. phagocytophilum* benzeri inklüzyon cisimciklerine rastlanmış; aynı hayvanlara ait kan serumlarında IFAT ile 107 örnekte (% 14.86) *A. phagocytophilum* 'a karşı şekillenen antikorlar belirlenmiş; 178 koyuna ait kan rnekleri PZR ile analiz edilmiş ve 22 'inde (% 12.35) *A. phagocytophilum* spesifik band belirlenmiştir (32). *A. phagocytophilum* 'un epidemiyolojisi ile ilgili diğer bir çalışma da Doğu Anadolu Bölgesindeki koyun ve keçiler üzerinde yürütülmüş; Bingl, Elazığ, Malatya ve Muş illerinde 291 koyun ve 131 keçi olmak üzere toplam 422 hayvana ait kan rnekleri PZR ile incelenmiş; koyunların 55 'inde (% 18.90) ve keçilerin 28 'inde (% 21.37) *A. phagocytophilum* pozitiflik belirlenmiştir (27). Güney Doğu Anadolu Bölgesinde koyun ve keçilerde *A. phagocytophilum* 'un varlığı ve yaygınlığı üzerine herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu alışmada PZR yöntemi kullanılarak şanlıurfa yöresindeki koyun ve keçilerde *A. phagocytophilum* 'un varlığı ve yaygınlığı araştırılmış, koyun ve keçilerden elde edilen 208 (134 koyun, 74 keçi) kan rneği PZR ile analiz edilmiş, 8 koyun (% 5.97) ve 1 keçi (% 1.35) olmak üzere toplam 9 hayvanda (% 4.33) *A. phagocytophilum* 'un varlığı tespit edilmiştir. Böylece *A. phagocytophilum* 'un varlığı şanlıurfa yöresinde ilk defa ortaya konmuş, özellikle etkenin vektörlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.*2001; 51: 2145-65.
2. Düzl  Ö, İnci A. Sıg rlarda anaplasmosis. In: İnci A, K roğlu E, Karaer Z ve ark.(Edit rler). Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği, 2013: 114-121.
3. Inokuma H. Vectors and resevoir hosts of Anaplasmataceae. In: Raoult D, Parola P. (Editor.) *Rickettsial Diseases*. New York: Taylor & Francis Group LLC 2007: 199-212.
4. Rymaszewska A, Grenda S. Bacteria of genus *Anaplasma*-characteristic of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Vet Med Czech* 2008; 53: 573-584.
5. Torino A, Alongi A, Naranjo V, et al. Prevalance and genotypes of *Anaplasma* species and habitat suitability for ticks in a mediterranean ecosystem. *App Environ Microb* 2008; 74: 7578-7584.
6. Dumler JS. *Anaplasma* and *Ehrlichia* Infection. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1063: 361-373.
7. Eren H, Karagen  T. Rickettsiales. In: Dumanlı N, Karaer Z. (Edit rler). *Veteriner Protozooloji*. Ankara: Medisan, 2010: 229-238.
8. Rar V, Golovljova I. *Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Candidatus Neoehrlichia* bacteria: pathogenicity, biodiversity and molecular genetic characteristics, a review. *Infect Genet Evol* 2011; 11: 1842-1861.
9. Karatepe M, Karatepe B. Anaplasmosis. In: İnci A, K roğlu E, Karaer Z, Eren H, Yukarı BA, Dumanlı N, Aydın L, Yıldırım A. (Edit rler). *Parazit Hastalıkları*. Türkiye Parazitoloji Derneği, 2013: 812-815.
10. Talat R, Khanum T, Haydar A. Studies on mammalian haemaprotozoan parasites of NWFP Pakistan. *Pak J Biol Sci* 2005; 8: 726-729.
11. Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol* 2010; 167: 108-122.
12. Alessandra T, Caracappa S. Tick-borne diseases in sheep and goats : Clinical and diagnostic aspects. *Small Rum Res* 2012; 1065: 6-11.
13. Ogden NH, Casey ANJ, French NP, et al. Review of studies on the transmission of *Anaplasma phagocytophilum* from sheep: implications for the force of infection in endemic cycles. *Exp Appl Acaro* 2002; 28(1-4): 195-202.
14. Richter P, Kimsey R, Madigan J, et al. *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichieae). *J Med Entomol* 1996; 33: 1–5.
15. Stuen S. Tick-borne infections in small ruminants in northern Europe. *Small Rum Res*

2013; 110: 142-144.

16. Friedhoff K. Tick-borne disease of sheep and goats caused by *Babesia*, *Theileria* or *Anaplasma* spp. *Parasitologia* 1997; 39: 99-109.
17. Hornok S, Meli ML, Erdos A, et al. Molecular characterization of two different strains of haemotropic mycoplasmas from a sheep flock with fatal haemolytic anemia and concomitant *Anaplasma ovis* infection. *Vet Microbiol*, 2009; 136: 372-377.
18. Stoltz WH. Ovine and caprine anaplasmosis. In: Coetzer JAW, Tustin RC. (Editors). *Infectious Diseases of Livestock*. Cape Town: Oxford University Press, 2004: 617-624.
19. Kaufmann J. *Parasitic infections of domestic animals: a diagnostic manual*. Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 1996.
20. McQuiston JH, Paddock CD, Holman RC, et al. Human ehrlichioses in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 635-642.
21. Lotric-Furlan S, Petrovec M, Zupanc TA, et al. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 424-428 .
22. Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, et al. Ehrlichioses in humans epidemiology, clinical presentation, diagnosis and treatment. *Clin Infect Dis* 2007; 45(1): 45-51.
23. Woldehiwet Z. *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1078: 446-460.
24. Gokce HI, Moldehivet Z. Differential haematological effects of tick-borne fever in sheep and goats. *J Vet Med* 1999; 46: 105-115.
25. Leah AC. Ehrlichiosis and related infections. *Vet Clin Small Anim* 2003; 33: 863-884.
26. Aktas M. A survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens. *Vet Parasitol* 2014; 200 (3-4): 276-783.
27. Altay K, Dumanli N, Aktas M. et al. Survey of *Anaplasma* infections in small ruminants from East part of Turkey. *Jornal of the Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University* 2014; 20(1): 1-4.
28. d'Oliveria C, van der Weide M, Habela MA, et al. Detection of *Theileria annulata* in blood by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2665-2669.
29. Dumanli, N, Aktas M, Cetinkaya B, et al. Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey. *Vet Parasitol* 2005; 127(1): 15-21.
30. Kawahara M, Rikihisa Y, Lin Q, et al. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 1102-1109.
31. Derdakova M, Stefancikova A, Spitalska E, et al. Emergence and genetic variability of *Anaplasma* species in small ruminants and ticks from Central Europe. *Vet Microbiol* 2011; 153: 293-298.

32. Gokce HI, Genc O, Akca A, et al. Molecular and serological evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection farm animals in the Black Sea Region of Turkey. *Acta Vet Hung*, 2008; 56(3): 281-292.
33. Grova L, Olesen I, Steinshamn H, et al. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection and effect on lamb growth. *Acta Vet Scand* 2011; 53: 30-36.
34. Lillini E, Macri G, Proietti G, et al. New findings on anaplasmosis caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1081: 360-370.
35. Stuen S, Bergström K. Serological investigation of granulocytic *Ehrlichia* infection in sheep in Norway. *Acta Vet Scand* 2001; 42: 331-338.
36. Zhan L, Cao WC, Jiang JC, et al. *Anaplasma phagocytophilum* in livestock and small rodents. *Vet Microbiol* 2010; 144: 405-408.
37. Aktas M, Vatansever Z, Altay K, et al. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from Turkey. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010; 104: 10-15.
38. Aktas M, Altay K, Dumanli N. Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey. *Ticks Tick Borne Dis* 2011; 2: 62-66.
39. Bekker CP, de Vos S, Taoufik A, et al. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantum* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. *Vet Microbiol* 2002; 89(2-3): 223-238.
40. Schouls LM, Van de Pol I, Rijpkema SG, et al. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 1999; 37(7): 2215-2222.
41. Uilenberg G. *Theileria* species of domestic livestock. In: Irvin, AD, Cunningham MP, Young AS. (Editors). *Advances in the Control of Theileriosis*. Martinus Nijhoff, The Hague, 1981: 4-37.
42. Uilenberg, G. Babesiosis. In: Service MW. (Editor). *Encyclopedia of Arthropod-Transmitted Infections of Man and Domesticated Animals*. CABI Publishing, Wallingford, 2001: 53-60.
43. Ahmed JS, Luo J, Schnittger L, et al. Phylogenetic position of small ruminant infecting piroplasms. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1081: 498-504.
44. Hashemi-Fesharki, R. Tick-borne diseases of sheep and goats and their related vectors in Iran. *Parasitologia* 1997; 39: 115-117.
45. Altay K, Dumanli N, Aktas M. Molecular identification, genetic diversity and distribution of *Theileria* and *Babesia* species infecting small ruminants. *Vet Parasitol* 2007; 147(1-2): 161-165.
46. Nagore D, García-Sanmartín J, García-Pérez AL, et al. Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in sheep population from Northern Spain. *Int J Parasitol* 2004; 34: 1059-1067.

47. Bauman R, Die kleinasiatische schafftheilerios. Berliner and Meunchener Tieraerztliche Wnhenschrift 1939; 30: 469-474.
48. Hoffmann G, Hörchner F, Schein E, et al. Saisonalis auftrete von zecken und piroplasmaen bei haustieren in den asiatischen provinzen der Türkei. Berl Münch Tiraerztl Wschr 1971; 8: 152-156.
49. Aydın MF, Aktas M, Dumanli N. Molecular identifiaion of *Theileria* and *Babesia* in sheep and goats in the Black Sea Rgeion of Turkey. Parasitol Res 2013; 112(8): 2817-2824.
50. İnci A, Nalbantoglu, S. Cam Y. et al. Kayseri yöresinde koyun ve keçilerde theileriosis ve kene enfestasyonları. Turkish Journal Veterinary and Animal Sciences 2003; 27: 57-60.
51. Lestoquard F, Ekrem I. Les piroplasmoses du mouton en Turquie. Bull Soc Pathol Exot 1931; 2: 822-826.
52. İnci A, Karaer Z, İça A. Kayseri yöresinde koyun ve keçilerde babesiosis. FÜ Sağ Bil Derg 2002; 16(1): 79-83.
53. Sevinç F, Dik B. Konya yöresindeki koyunlarda *Babesia ovis*'in ELISA ile teşhisi. Vet Bil Derg 1996; 12(2): 73-79.
54. Açıcı M, Umur Ş, Kurt M, ve ark. Orta Karadeniz bölgesi ve Sivas yöresi sığır ve koyunlarında kan parazitlerinin retrospektif incelenmesi. 15th. Ulusal Parazitoloji Kongresi, pp:166, 2007, Kayseri ve Ürgüp.
55. Schichnitter L, Yin H, Gubbels MJ, et al. Phylogeny of sheep and goat *Theileria* and *Babesia* parasites. Parasitol Res 2003; 91: 398-406.
56. Altay K, Dumanli N, Aktas M. A study on ovine tick-borne hemoprotozoon parasites (*Theileria* and *Babesia*) in the East Black Sea Region of Turkey. Parasitol Res 2012; 111(1): 149-153.
57. Pfaffle M, Littwin N, Muders SW, et al. The ecology of tick-borne diseases. Int J Parasitol 2013; 43(12-13): 1059-1077.
58. Arslan ÖM. Türkiye’de hayvanlarda kene enfestasyonları ve kenelerin bulaştırdığı hastalıkların durumu. 14. Ulusal Parazitoloji Kongresi, (YM02-04), 2005, İzmir.
59. Aydın L. Güney Marmara Bölgesi Ruminantlarında Görülen Kene Türleri ve Yayılışları. Uludağ Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Bursa, 1994.
60. Aydın L, Bakırcı S. Geographical distribution of ticks in Turkey. Parasitol Res 2007; 101: 163-166.
61. Dumanlı N, Altay K, Aydın MF. Türkiye’de sığır, koyun ve keçilerde belirlenen kene türleri. Türkiye Klinikleri Vet Bil Derg 2012; 3(2): 67-72.
62. Gargılı A. Kenelerin vektörlüğü ve Türkiye’de durum. Ankem Derg 2009; 23: 249-252.
63. Karaer Z, Yukarı BA, Aydın L. Türkiye Keneleri ve Vektörlükleri. In: Özcel MA, Daldal N. (Editörler). Parazitolojide Artropod Hastalıkları ve Vektörler. Türkiye Parazitoloji Derneği, 1997: 363-433.

8. ÖZGEÇMİŞ

- 1. Adı Soyadı** : Müzeyyen ATAŞ
- 2. DoğumYeri ve Tarihi** : Batman -28.03.1985
- 3. Medeni Durumu** : Evli
- 4. Yabancı Dili** : İngilizce
- 5. Eğitimi**
- İlk Öğretim : 1997, Atatürk İlk Öğretim Okulu,
Batman
- Lise Eğitimi : 2003, Atatürk Yabancı Dil Ağırlıklı
Lise, Adıyaman
- Yüksek Okul : 2011, Bitlis Eren Üniversitesi, Sağlık
Yüksek Okulu
- 6. Çalıştığı Kurumlar** : Palu Devlet Hastanesi (2011-2013),
Elazığ Ruh ve Sinir Hastalıkları
Hastanesi (2013- Devam Ediyor)