



**AFYONKARAHİSAR İLİNDEKİ KOYUN VE  
KEÇİLERDE *BABESIA* VE *THEILERIA* TÜRLERİNİN  
YAYGINLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Ahmet GÖKSU

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Hatice ÇİÇEK

Tez No: 2022-001

Afyonkarahisar

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**AFYONKARAHİSAR İLİNDEKİ KOYUN VE KEÇİLERDE  
*BABESIA* VE *THEILERIA* TÜRLERİNİN YAYGINLIĞININ  
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan  
Ahmet GÖKSU**

**Danışman  
Prof. Dr. Hatice ÇİÇEK**

**Tez No: 2022-001**

**AFYONKARAHİSAR**

## TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Parazitoloji Anabilim Dalı'nda** Ahmet GÖKSU tarafından hazırlanan “Afyonkarahisar İlindeki Koyun ve Keçilerde *Babesia* ve *Theileria* Türlerinin Yaygınlığının Araştırılması” adlı tez çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca 11/02/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir

**Başkan**

Prof. Dr. Bilal DİK

**Üye**

Prof. Dr. Hatice ÇİÇEK

**Üye**

Prof. Dr. Özlem DERİNBAY EKİCİ

**Üye**

Prof. Dr. Esma KOZAN

**Üye**

Prof. Dr. Mine DOSAY AKBULUT

Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
..... / ..... / ..... tarih ve  
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esma KOZAN  
Enstitü Müdürü

## **BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

11/02/2022

Ahmet GÖKSU

## ÖZET

### AFYONKARAHİSAR İLİNDEKİ KOYUN VE KEÇİLERDE *BABESIA* VE *THEILERIA* TÜRLERİNİN YAYGINLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Bu çalışma ile 2019 yılı Mart–Kasım ayları arasında Afyonkarahisar ilinin Sinanpaşa, Hocalar, Şuhut, Bolvadin ve İhsaniye ilçelerindeki küçük ruminantlarda *Theileria* ve *Babesia* türlerinin yaygınlığı araştırılmıştır. Araştırma merkezlerindeki 200’ü koyun, 200’ü keçi olmak üzere 400 hayvandan EDTA’lı tüplere kan numunesi alınmıştır. Kan örneklerinden hazırlanan sürme frotiler mikroskopik olarak *Theileria* ve *Babesia* piroplazmaları yönünden incelenmiştir. EDTA’lı kanlardan ekstrakte edilen DNA örnekleri RLB-F2 ve RLB-R2 primerleri kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon ürünleri, *Theileria* ve *Babesia* soy ve türlerine özgü problemlerin bağlandığı bir membran üzerinde hibridizasyona bırakılarak Reverse line blotting (RLB) tekniği ile incelenmiştir.

Kan frotilerinin mikroskopik muayenesinde 17 koyunda (%4,25) *Theileria* spp. piroplazma formları görülürken keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerine rastlanılmamıştır. RLB yöntemi ile 400 kan örneğinin 97 (%24,25)’inde *Theileria ovis* türü ile tekli enfeksiyon tespit edilmiştir. PCR tekniği ile bu tür 400 örneğin 74 (%18,5)’ünde bulunmuştur. Koyun ve keçilerde diğer *Theileria* türleri (*Theileria lestoquardi*, *Theileria luwenshuni*, *Theileria uilenbergi*) ile genotiplerine (*Theileria* sp. MK, *Theileria* sp. OT1, *Theileria* sp. OT3) ve *Babesia* türlerine rastlanılmamıştır. Çalışma süresince koyun ve keçiler üzerinden 145 olgun kene toplanmıştır.

Toplanan kenelerin 97’si (%66,8) *Rhipicephalus bursa*, 40’ı (%27,58) *Dermacentor marginatus*, 4’ü (%2,75) *R. turanicus* ve 4’ü (%2,75) *R. sanguineus* olarak teşhis edilmiştir. *Rhipicephalus bursa* olarak teşhis edilen 10 adet dişi keneden elde edilen yumurta kümelerinde *Babesia* spp.’ye rastlanılmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Babesia*, Keçi, Koyun, PCR, RLB, *Theileria*

## SUMMARY

### INVESTIGATION OF THE PREVALENCE OF *BABESIA* AND *THEILERIA* SPECIES IN SHEEP AND GOATS IN AFYONKARAHISAR

This study investigated the prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in small ruminants between March and November 2019 in Sinanpaşa, Hocalar, Şuhut, Bolvadin, and İhsaniye districts of Afyonkarahisar province. Blood was taken from 400 animals, 200 of which were sheep and 200 of which were goats. Thin smear preparations prepared from blood samples were examined microscopically for *Theileria* and *Babesia* piroplasms. DNA samples extracted from blood were amplified by Polymerase chain reaction (PCR) using primers RLB-F2 and RLB-R2. Amplification products were examined by the Reverse line blotting (RLB) technique, allowing hybridization on a membrane to which probes specific to *Theileria* and *Babesia* strains and species were added.

In the microscopic examination of blood smears, *Theileria* spp. was found in 17 sheep (4.25%). While piroplasmic forms were seen in sheep, *Theileria* and *Babesia* species were not found in goats. The RLB technique detected a single infection with *T. ovis* in 97 (24.25%) of 400 blood samples. PCR was used to detect *T. ovis* species in 74 (18.5 percent) of the 400 samples. Other *Theileria* species (*Theileria lestoquardi*, *Theileria luwenshuni*, *Theileria uilenbergi*) and genotypes (*Theileria* sp. MK, *Theileria* sp. OT1, *Theileria* sp. OT3), as well as *Babesia* species, were not detected in sheep and goats.

A total of 145 adult ticks from sheep and goats were collected for the investigation. *Rhipicephalus bursa* (66.8%), *Dermacentor marginatus* (27.58%), *R. turanicus* (2.75%), and *R. sanguineus* (2.75%) were identified among the ticks collected. In 10 egg clusters collected from female *R. bursa* ticks, no *Babesia* species were found.

**Keywords:** *Babesia*, Goat, PCR, RLB, Sheep, *Theileri*



## İÇİNDEKİLER

|                                                             | SAYFA |
|-------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET                                                        | I     |
| SUMMARY                                                     | II    |
| ÖNSÖZ SAYFASI                                               | III   |
| İÇİNDEKİLER                                                 | IV    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR                                     | VI    |
| ŞEKİLLER                                                    | VIII  |
| ÇİZELGELER                                                  | IX    |
| RESİMLER                                                    | X     |
| 1.GİRİŞ                                                     | 1     |
| 1.1. Babesiosisin Tarihçesi ve Taksonomisi                  | 2     |
| 1.2. Koyunlarda ve Keçilerde Babesiosis                     | 3     |
| 1.3. <i>Babesia</i> Türlerinin Yaşam Döngüsü                | 5     |
| 1.3.1. Omurgalı Konakta Gelişim                             | 5     |
| 1.3.2. Vektör Kenedeki Gelişim                              | 6     |
| 1.4. Epidemiyoloji                                          | 7     |
| 1.5. Türkiye'de Koyun ve Keçilerde Babesiosisin Yayılışı    | 8     |
| 1.6. Babesiosisde Bağışıklık                                | 10    |
| 1.7. Babesiosisde Patojenite ve Klinik Bulgular             | 11    |
| 1.8. Babesiosisde Teşhis                                    | 12    |
| 1.9. Babesiosisde Korunma ve Tedavi                         | 14    |
| 1.10. Theileriosisin Tarihçesi ve Taksonomisi               | 15    |
| 1.11. Koyunlarda ve Keçilerde Theileriosis                  | 15    |
| 1.12. <i>Theileria</i> Türlerinin Yaşam Döngüsü             | 17    |
| 1.12.1. Omurgalı Konakta Gelişim                            | 18    |
| 1.12.2. Vektör Kenedeki Gelişim                             | 19    |
| 1.13. Epidemiyoloji                                         | 19    |
| 1.14. Türkiye'de Koyun ve Keçilerde Theileriosisin Yayılışı | 20    |
| 1.15. Theileriosisde Bağışıklık                             | 22    |
| 1.16. Theileriosisde Patojenite ve Klinik Bulgular          | 22    |
| 1.17. Theileriosisde Teşhis                                 | 23    |

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.18. Theileriosisde Korunma ve Tedavi                                           | 24        |
| <b>2. MATERYAL ve METOT</b>                                                      | <b>25</b> |
| 2.1. Saha çalışmaları                                                            | 25        |
| 2.1.1. Araştırma merkezleri ve hayvan materyali                                  | 25        |
| 2.2. Kan örneklerinin alınması ve kenelerin toplanması                           | 27        |
| 2.3. Laboratuvar Çalışmaları                                                     | 28        |
| 2.3.1. Mikroskopik muayene                                                       | 28        |
| 2.4. Kenelerin Tür Teşhisleri ve Yumurtlatılması                                 | 28        |
| 2.5. Genomik DNA İzolasyonu                                                      | 29        |
| 2.5.1. Referans DNA Örnekleri                                                    | 29        |
| 2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Sonuçların Görüntülenmesi              | 29        |
| 2.7. RLB Membranın Hazırlanışı                                                   | 31        |
| 2.8. Reverse Line Blotting                                                       | 32        |
| 2.8.1. RLB Yönteminde Kullanılan Problar                                         | 32        |
| 2.9. Laboratuvar Aşamasında Kullanılan Sarf Malzemeler                           | 34        |
| 2.9.1. Mikroskopik İncelemede Kullanılan Solüsyonlar                             | 34        |
| 2.9.2. PCR Tekniğinde Kullanılan Solüsyonlar                                     | 34        |
| 2.9.3. RLB Tekniğinde Kullanılan Solüsyonlar                                     | 34        |
| 2.10. Agaroz Jelin Hazırlanışı                                                   | 35        |
| 2.11. İstatistiksel Analiz                                                       | 35        |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                               | <b>36</b> |
| 3.1. Koyun ve Keçilerde <i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> Türlerinin Yaygınlığı | 36        |
| 3.2. Enfeste Koyun ve Keçilerdeki Kene Türleri                                   | 40        |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                               | <b>43</b> |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                                      | <b>50</b> |
| <b>6. KAYNAKLAR</b>                                                              | <b>52</b> |
| <b>7. EKLER</b>                                                                  | <b>61</b> |
| 7.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı                                    | 61        |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                  | <b>62</b> |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

**C3:** komplement 3

**CF:** Komplement Fikzasyon

**dk.:** Dakika

**DNA:** Deoksiribonükleik asit

**DNaz:** Deoksiribonükleaz

**dNTP:** Deoksinükleotridfosfat

**ECL:** Chemiluminescent Detection Agent

**EDAC:** 1-ethyl-3 (dimethylaminopropyl) carbodiimide

**EDTA:** Etilendiamintetra-asetik asit

**ELISA:** Enzim Linked Immuno Sorbent Assay

**HCl:** Hidroklorik asit

**ICS:** İmmunokromatografik strip

**IFAT:** İndirek Floresan Antikor Testi

**IHA:** İndirekt Hemaglutinasyon

**IgG:** İmmunoglobulin G

**KCl :** Potasyum klorür

**LAMP:** Loop Mediated Isothermal Amplification

**LAT:** Latex Aglutinasyon Testi

**M:** Molar

**ml:** Mililitre

**mM:** Milimolar

**NK:** Doğal katil hücreleri

**NO:** Nitrik oksit

**pH:** Potansiyel hidrojen

**pmol:** Pikomol

**PAMPs:** Patojenle ilişkili moleküler kalıplar

**PCR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
**RIA:** Radioimmunoassay  
**RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism  
**RLB:** Reverse Line Blotting  
**RNA:** Ribonükleik asit  
**RNaz:** Ribonükleaz  
**SDS:** Sodyum Dodesil Sülfat  
**sp.:** Species (tür)  
**spp. :** Species (türler)  
**SSPE:** Standard Sodyum Fosfat EDTA  
**TAE:** Tris-Asetik asit-EDTA tampon solüsyonu  
**TLRs:** Toll-like reseptörler  
**TÜİK:** Türkiye İstatistik Kurumu  
**UV:** Ultraviyole  
**µl:** Mikrolitre  
**µm:** Mikrometre

## ŞEKİLLER

|                                                                                           | SAYFA |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 1.1. <i>Babesia</i> türlerinin yaşam siklusu                                        | 5     |
| Şekil 1.2. <i>Theileria</i> türlerinin yaşam siklusu                                      | 17    |
| Şekil 2.1. Araştırma merkezleri ve konumları                                              | 25    |
| Şekil 3.1. Enfeste koyun ve keçilerden toplanan olgun kenelerin türlere göre dağılımı (%) | 41    |



## ÇİZELGELER

|                                                                                                                                                                                  | SAYFA |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 2.1. Hayvan türlerinin araştırma merkezlerine göre dağılımı                                                                                                              | 26    |
| Çizelge 2.2. Touchdown PCR için gerekli şartlar                                                                                                                                  | 30    |
| Çizelge 2.3. PCR Reaksiyon içeriği                                                                                                                                               | 31    |
| Çizelge 2.4. RLB problemlerinin sekans dizilimleri ve yoğunlukları                                                                                                               | 33    |
| Çizelge 3.1. Muayene edilen koyun ve keçilerde mikroskopik bakı, PCR ve RLB yöntemlerine göre belirlenen <i>Theileria</i> pozitifliklerinin araştırma merkezlerine göre dağılımı | 37    |
| Çizelge 3.2. Muayene edilen koyun ve keçilerde PCR sonuçlarının ilçelere ve hayvan türlerine göre dağılımı                                                                       | 38    |
| Çizelge 3.3 Muayene edilen koyun ve keçilerde RLB sonuçlarının ilçelere ve hayvan türlerine göre dağılımı                                                                        | 40    |
| Çizelge 3.4. Kenelerin konak ve araştırma merkezlerine göre dağılımı                                                                                                             | 41    |
| Çizelge 3.5: Kene türlerinin konak ve çalışma merkezlerine göre dağılımı                                                                                                         | 42    |

## RESİMLER

### SAYFA

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resim 3.1. <i>Theileria</i> spp. piroplasm formları (orijinal)                      | 36 |
| Resim 3.2. Saha örnekleri ve pozitif kontrollere ait PCR ürünlerinin RLB görüntüsü. | 39 |



## 1. GİRİŞ

Tropik ve subtropik iklim kuşaklarında yer alan ülkelerde theileriosis ve babesiosis gibi kene kaynaklı protozoer enfeksiyonlar evcil ruminant yetiştiriciliğinde önemli bir sorun oluşturmaktadır (Jongejan ve Uilenberg, 1994).

Subtropik iklim kuşağında yer alan Türkiye’de kenelerle taşınan hastalıklar yaygın olarak görülmektedir. Bugüne kadar insanlarda ve hayvanlarda kene kaynaklı 19 hastalığın varlığı açıklanmıştır (İnci vd., 2016).

Türkiye’de 42 milyon 126 bin baş koyun, 11 milyon 985 bin baş keçi varlığı bildirilmiştir. Afyonkarahisar koyun ve keçi yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı bir il olup, koyun sayısı bakımından (1.124.236) Ege bölgesi illeri arasında 1. sırada, keçi sayısı bakımından (110.810) ise 7. sırada yer almaktadır (TUİK, 2020).

*Theileria* ve *Babesia* türleri evcil ve yabani hayvanlarda, bazı *Babesia* türleri aynı zamanda insanlarda klinik ve subklinik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu hastalıklar, ölüm, verim düşüklüğü, veteriner hekim hizmet maliyeti ve kene kontrol masrafları ile önemli ölçüde ekonomik kayba yol açmaktadır. Akut enfeksiyonu geçiren hayvanların enfeksiyon kaynağı olmaları da ekonomik kaybın uzun süre devam etmesine neden olmaktadır (Bilgiç vd., 2017; Aydın ve Dumanlı, 2019). Bu enfeksiyonların yaygınlıklarının araştırılması ve vektör kenelerin tespiti etkili korunma ve kontrol yöntemlerinin planlanmasında önem taşımaktadır (Jongejan ve Uilenberg, 2004).

Babesiosis ve theileriosisin teşhisi klinik bulguların değerlendirilmesi, mikroskopik muayene, serolojik yöntemler ve moleküler tekniklerle yapılmaktadır. Mikroskopik muayene tür teşhisinde ve akut enfeksiyonu geçiren hayvanlarda düşük parazitemi nedeniyle etken tespitinde yetersiz kalmaktadır. Teşhis amacıyla uzun süre kullanılan serolojik yöntemlerin kullanımı, türler arası çapraz reaksiyon ve yanlış negatif sonuç vermeleri nedeniyle sınırlandırılmıştır. Son yıllarda taşıyıcı hayvanlardaki ve vektör kenelerdeki etkenlerin tespiti amacıyla daha duyarlı ve

güvenilir olan Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve Reverse line blot (RLB) gibi moleküler teknikler geliştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu türe özgü primerler kullanılarak hastalıkların tür düzeyinde tespitini sağlamaktadır. Birden fazla türle enfeksiyonun olduğu durumlarda aynı anda tüm etkenlerin tespit edilmesine olanak veren RLB tekniği ise parazitoloji alanında özellikle kan parazitlerinin tespiti amacıyla yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Sevinc ve Dik, 1996; Dumanlı vd., 1997; Bilgiç vd., 2017; Ozubek ve Aktas, 2017a).

Afyonkarahisar ilindeki koyun ve keçilerde *Babesia* ve *Theileria* türlerinin yaygınlığı ile ilgili kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Afyonkarahisar ilindeki koyun ve keçilerde *Babesia* ve *Theileria* türlerinin varlığı ile yaygınlığı mikroskopik muayene, PCR ve RLB yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak araştırılmış, bu hayvanlar üzerinden toplanan dişi kenelerden elde edilen yumurta kümeleri de *Babesia* spp.'nin mevcudiyeti yönünden incelenmiştir.

### **1.1. Babesiosisin Tarihçesi ve Taksonomisi**

Victor Babes, 19. yüzyılın sonunda Romanya'daki sığırların eritrositlerinde gördüğü mikroorganizmaları sığır hemoglobinürisi veya kırmızı su humması etkeni olarak tanımlamış, koyunların kırmızı kan hücrelerinde de benzer etkenlere rastlamıştır (Babes, 1888). Smith ve Kilborne (1893), ABD'de Teksas sığır humması etkenini *Pyrosoma bigeminum* olarak adlandırmış, hastalığın keneler tarafından nakledildiğini bildirmiştir. Aynı yıl (1893), Starcovici sığırlarda tespit ettiği etkenleri *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*, koyunlarda bulduğu etkeni *Babesia ovis* olarak isimlendirmiş olup bu parazit formlarına, genellikle armut şeklinde olmaları nedeniyle 'Piroplasm' adı verilmiştir (Starcovici, 1893).

*Babesia* türlerinin Systema Natura (2000)'ya göre sınıflandırmadaki yeri aşağıdaki gibidir (Brands, 1989-2005).

Üst alem: *Corbicata* Lankester, 1878

Alem: *Chromista* Cavalier-Smith, 1981

Alt alem: *Harosa* Cavalier-Smith, 2000

Aşağı alem: *Halvaria* Cavalier-Smith, 2010

Üst şube: *Alveolata* Cavalier-Smith, 1991

Şube: *Miozoa* Cavalier-Smith, 1987

Alt şube: *Myzozoa* Cavalier-Smith ve Chao, 2004

Aşağı şube: *Apicomplexa* Levine, 1970

Üst sınıf: *Sporozoa* Leuckart, 1879

Sınıf: *Coccidiomorphea* Doflein, 1901

Alt sınıf: *Hematozoa* Vivier, 1982

Üst takım: *Aconoidia* Cavalier-Smith, 2014

Takım: *Piroplasmida* Wenyon, 1926

Aile: *Babesiidae* Poche, 1913

Cins: *Babesia* Starcovici, 1893

## 1.2. Koyunlarda ve Keçilerde Babesiosis

Koyun ve keçilerde babesiosise *Babesia ovis*, *B. motasi*, *B. crassa*, *B. foliata*, *B. taylori*, *B. sp.* Xinjiang, *B. sp.* BQ1 ile *Babesia sp.* BQ1'in Lintan ve Ningxian suşlarının neden olduğu bildirilmiştir (Hasherni-Fesharki ve Uilenberg, 1981; Levine, 1985; Uilenberg, 2001; Liu vd. 2007; Guan vd., 2008).

*Babesia* türleri mikroskopik olarak merozoitlerin büyüklüklerine göre büyük ve küçük olmak üzere iki gruba ayrılır. Küçük *Babesia* etkenleri, 1,0-2,5 µm büyük *Babesia* etkenleri ise 2,5-5 µm uzunluğundadır. Küçük *Babesia* etkenlerinde çift armut formları arasındaki açı geniş, büyük *Babesia* etkenlerinde ise çift armut formları arasındaki açı dardır. *Babesia ovis*, *B. taylori* ve *B. foliata* küçük *Babesia* türlerinden, *B. motasi* ve *B. crassa* ise büyük *Babesia* türlerindendir (Chauvin vd., 2009).

*Babesia ovis*, genellikle yuvarlak formda olup oval, tek veya çift armut formları da mevcuttur. Konak eritrositinin çeperine yakın yerleşim gösteren türün çift armut formları arasındaki açı geniştir (Levine, 1985).

*Babesia taylori* merozoitleri, çoğunlukla oval veya yuvarlak, nadiren armut formundadır. *Babesia foliata* merozoitleri ise *B. ovis*'e benzemekle birlikte yaprak şeklindedir (Levine, 1985).

*Babesia motasi* merozoitleri genellikle tek veya çift armut formunda olup *B. bigemina*'ya benzer (Levine, 1985).

Büyük *Babesia* türlerinden olan *B. crassa* eritrositler içinde genellikle dörtlü formda bulunur (Levine, 1985).

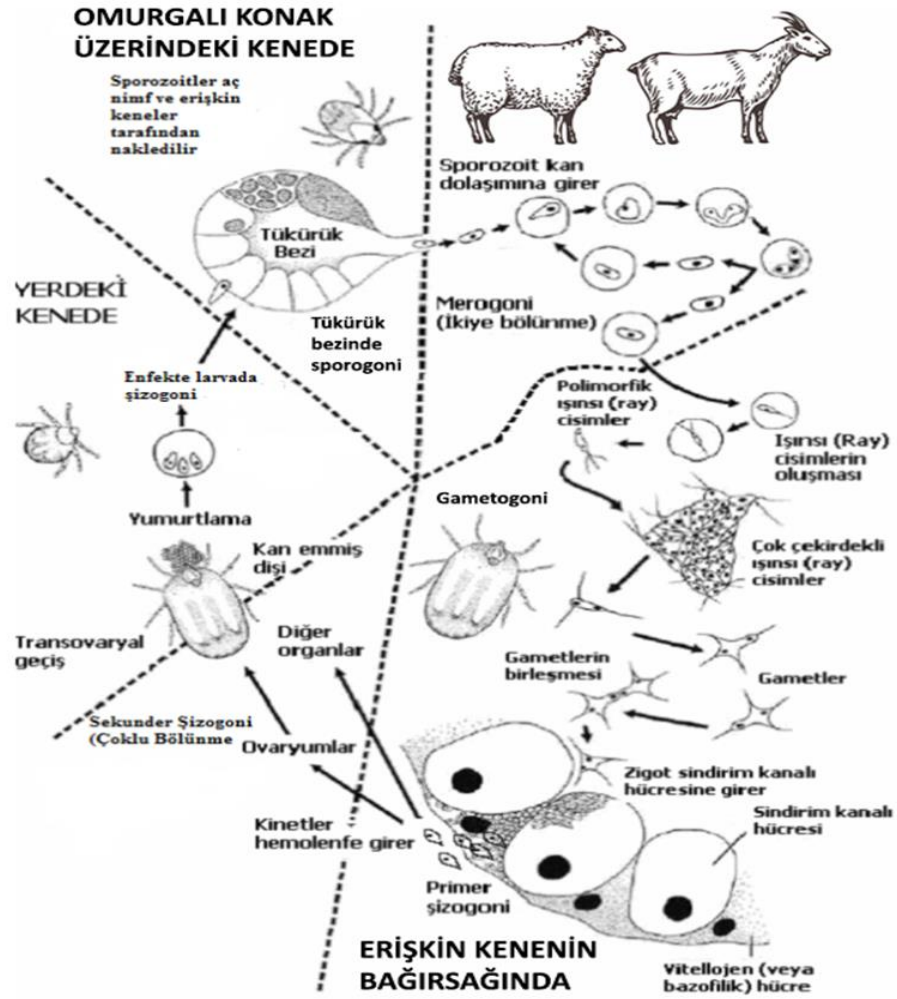
*Babesia* sp. Xinjiang ve *B. sp.* BQ1 Çin'de tespit edilmiş iki yeni türdür. *Babesia* sp. Xinjiang 2,42 µm uzunluğunda ve çift armut formundadır (Liu vd. 2007).

Eritrositler içinde farklı gelişim aşamalarında bulunmaları, konağa taşınırken boyut ve şekil değişiklikleri oluşması gibi nedenler *Babesia* türlerinin morfolojik ayrımını güçleştirmektedir (Homer vd., 2000).

*Babesia* merozoitleri, diğer ökaryotik hücrelerde olduğu gibi çekirdek, sitoplazma, hücre zarı, endoplazmik retikulum (ER), golgi aygıtı ve mitokondri gibi organellere sahiptirler. Alveolata kökünde yer almaları nedeniyle sahip oldukları alveol tabakası ve ikincil bir mikrotübül tabakası, parazit hareketi ile konak hücreye girişte görev almaktadır (Lew vd., 2002). Hücre içi gelişim gösteren *Babesia* türlerinde apikal kompleks adı verilen yapı konak hücreyi bulmayı, hücreye girmeyi ve hücreye adapte olmayı sağlamaktadır. Kutup halkası, rhoptri, mikronem ve subpellicular mikrotubullerden oluşan yapı konak hücreye giriş tamamlandıktan sonra genellikle rezorbe olmaktadır. *Babesia* türlerinde apikal kompleks organellerinden olan konoid yoktur (Blackman vd., 2001; Klinger vd., 2013).

### 1.3. Babesia Türlerinin Yaşam Döngüsü

*Babesia* türleri yaşam döngüsünde eşeyli çoğalmanın geçtiği ixodid kene ve eşeysiz çoğalmanın geçtiği omurgalı konak olmak üzere iki farklı konağa ihtiyaç duyarlar (Şekil 1.1).



Şekil 1.1: *Babesia* türlerinin yaşam siklusu (Bock vd., 2004)'den değiştirilerek

#### 1.3.1. Omurgalı Konakta Gelişim

*Babesia* türleri omurgalı konaklara ixodid kenelerce transstadial ve transovarial olarak taşınmaktadır. Vektör kene tükürüğü ile konakçıya verilen sporozoitler, doğrudan eritrositlere girerek, piroplazmik (trofozoit) forma dönüşürler (Uilenberg, 2006). Zorunlu hücre içi paraziti olan *Babesia* spp. konak eritrositi içine girerken

yüzeyinde bulunan ve ligand adı verilen moleküller eritrosit yüzeyindeki reseptörler ile etkileşmektedir. Hücre içine girdikten sonra da konak bağışıklık sisteminden kaçabilmektedirler (Yokoyama vd., 2006; Rodriguez vd., 2013). Enfekte kenenin kan emmesiyle birlikte tükürük salgısında bulunan sporozoitler konak kan dolaşımındaki eritrositlere endositozisle girerler. Sporozoitin temas ettiği eritrositin yüzeyinde meydana gelen invaginasyonla vakuol oluşmaksızın konak eritrositine giriş gerçekleşir. Eritrosit içine giren sporozoitler yuvarlaklaşarak trofozoit şekline dönüşürler. Trofozoitin olgunlaşması ile apikal kompleksi oluşturan yapılar tekrar oluşur. Olgun trofozoitin ikiye veya dörde bölünmesiyle oval, ameoboid ya da armut formlarına kadar değişen piroplasmik formlar meydana gelir. Trofozoit ikiye veya dörde bölünerek merozoitleri oluşturur. Çoğalma sonucu oluşan merozoitlerden meydana gelen öncü gamontlar, vektör kene tarafından alınıncaya kadar gelişmez. Enfekte eritrositin parçalanması ile serbest kalan diğer merozoitler, sağlam eritrositleri enfekte ederler. Eritrositten serbest kalan merozoitler sağlam eritrositlere girme esnasında apikal kompleksin bulunduğu ucu döndürerek invaginasyona neden olur. Merozoitlerin yüzeyinde bulunan complement 3 (C3) proteininin eritrositlerde bulunan C3 reseptörüne bağlanması ile penetrasyon meydana gelir. Merozoit yüzey örtüsü ile roptri ve mikronem proteinleri konak hücreye girişte kullanılan ligandlardır (Chapman ve Ward 1977; Dominguez vd., 2010; Besteiro vd., 2011; Asada vd., 2012; Gubbels ve Duraisingh 2012; Lobo vd., 2012). Eritrosit içinde çoğalma ya konağın ölümüne kadar ya da konağın bağışıklık sistemi, parazitin çoğalmasına son verene kadar devam eder. *Babesia* türleri, *Plasmodium* ve *Haemoproteus* türlerinden farklı olarak konak hücrede, hemoglobini kalıntı bırakmayacak şekilde metabolize ederek hemozoin pigmenti oluşturmazlar (Uilenberg, 2006).

### **1.3.2. Vektör Kenedeki Gelişim**

Vektör kenenin enfekte omurgalı konaktan emdiği kanın, kenenin orta bağırsağına gelmesi ile vektörde gelişim başlar. Enfekte eritrositlerle alınan öncü gamontlardan oluşan “Strahlenkörper” veya ‘ışınal cisimcik (ray body)’ adı verilen çıkıntılı formlar eritrosit içinde çoğalarak çok çekirdekli ışınal cisimcik toplulukları oluştururlar. Çok çekirdekli ışınal cisimciklerden tek çekirdekli ve haploid yapıda

çok sayıda mikro ve makro gametler meydana gelir. Mikro ve makro gametlerin birleşmesiyle oluşan zigot, sindirim hücrelerinde çoğaldıktan sonra basofilik hücrelerde daha fazla bölünme geçirerek çok sayıda 'ookinet', 'sporokinet' veya 'vermikül' olarak bilinen çomak şekilli hareketli formları oluşturur. Bu hareketli formlar kenenin hemolenfine geçerek malpighi tubul hücreleri, tükürük bezleri, dişilerde ovaryumlar gibi değişik hücre ve dokularda sekonder şizogoni ile ikinci nesil kinetleri şekillendirirler. Enfekte dişi kenenin yumurtalarıyla larval döneme transovarial nakil gerçekleşir. Enfekte larvalarda kinetler, tükürük bezi hücrelerine girerek sporogoni geçirirler. Bu eşeysiz çoğalma fazında önce sporoblastlar, vektör kenenin kan emmek için omurgalı konağa tutunmasıyla da sporoblastlardan enfektif form sporozoitler meydana gelir. Transovarial nakilde sporozoitlerin omurgalı konaklara nakli vektör kenenin larva, nimf ya da olgun aşamasında gerçekleşir (Wenyon, 1926; Mehlhorn vd., 1986; Uilenberg, 2006). Transstadial nakilde larva veya nimf döneminde enfekte konaktan kan emen vektör keneler, kanla birlikte etkenleri de alarak bir sonraki gelişme döneminde verirler. Vektör kenede gametogoninin tamamlanmasıyla oluşan ookinet, hemolenf ile tükürük bezi, diğer doku ve organlara gider. Tükürük bezi hücrelerinde sporogoni yolu ile çoğalarak sporoblastları oluşturur. Kenenin kan emmesi ile başlayan tomurcuklanma sonucunda enfektif form sporozoitler oluşur. Vektör kenenin kan emmeye başlamasından birkaç gün sonra olgunlaşan sporozoitler, kenenin tükürük salgısı ile aktifleşerek duyarlı konağa verilirler (Uilenberg, 2006).

#### **1.4. Epidemiyoloji**

Babesiosisin epidemiyolojisinde; bölgenin coğrafik konumu ve iklimi, bitki örtüsü, bölgedeki mevcut kene türleri ile mevsimsel aktiviteleri, kene enfestasyon ve enfeksiyon oranları, kapalı mekânda yetiştirilme veya meraya çıkarılma, aşılama, duyarlı konak mevcudiyeti, bölgedeki hastalık durumu ve yayılışı gibi faktörlerin etkili olduğu bildirilmiştir (Kuttler, 1981; İça vd., 2005). Enfeksiyonun subklinik seyrettiği hayvanlar vektör kene türleri için enfeksiyon kaynağı olmaları açısından epidemiyolojik önem taşır (Levine, 1985).

*Babesia ovis*; *Rhipicephalus bursa*, *R. turanicus*, *R. evertsi*, *Hyalomma anatolicum excavatum* ve *Ixodes persulcatus* türü kenelerle taşınmaktadır. *Babesia motasi*; *R. bursa*, *Haemaphysalis punctata*, *I. ricinus*, *Hae. parva* ve *D. silvarum* tarafından nakledilmektedir (Levine, 1985). *Babesia crassa*'nın *Hae. sulcata*, *Hae. parva*, *Hae. concinna* ve *Hae. inermis* tarafından taşınabildiği bildirilmiştir (Aktas, 2014). *Babesia* sp. Xinjiang'ın vektörü olarak *H. anatolicum* (Guan vd., 2009), *B. sp. BQ1*'in vektörleri olarak *Hae. qinghaiensis* ve *Hae. longicornis* türleri açıklanmıştır (Guan vd., 2010).

Babesiosis koyun ve keçilerde şiddetli seyrederken oğlak ve kuzularda hafif bir seyir göstermektedir. Enzoitik bölgelerde, vektör kene, parazit ve omurgalı konak arasında bir denge vardır. Enfekte vektör kenelerin yaygın olduğu bölgelerde bulunan koyunlar, sürekli olarak etkene maruz kaldıklarından premünisyon (nisbi bağışıklık) şekillenmektedir. Bu tür bağışıklığın görüldüğü enzootik stabil bölgelerde klinik semptomlara ender olarak rastlanmaktadır. Enzoitik instabil bölgelerde ise enfekte kenelerin az olması nedeniyle hayvanlarda yeterli düzeyde premünisyon oluşmamaktadır. Bu bölgelerde enfekte kene miktarındaki ani artışlar klinik enfeksiyonların ortaya çıkmasıyla sonuçlanmaktadır (Schnittger vd., 2004; Karatepe ve Karatepe, 2016).

### **1.5. Türkiye'de Koyun ve Keçilerde Babesiosisın Yayılışı**

Türkiye'de koyunlarda yaygın olarak görülen *B. ovis*, ilk kez 1899 yılında Nicolle ve Laveran tarafından İstanbul'da bildirilmiştir (Goksu, 1967). Daha sonra yapılan mikroskopik, serolojik ve moleküler yöntemler ile parazitin koyun ve keçilerdeki varlığı ve yayılışı ortaya konmuştur. Mikroskopik bakı sonuçlarına göre koyunlarda *B. ovis*'in prevalansı, %0,33-67,37 aralığında bulunmuştur. Bu türün bölgelere göre yayılışı; İç Anadolu'da %2,49-27,35, Doğu Anadolu'da %0,60-30,60, Güneydoğu Anadolu'da %0,65-2, Marmara'da %0,36-0,65, Ege'de %0,49-0,66, Karadeniz'de %1,18-67,37 olarak bildirilmiştir (Goksu, 1967; Hoffmann vd., 1971; Guralp vd., 1975; Tasci, 1989; Deger, 1990; Cakmak vd., 1991; Ozer vd., 1993; Sevinc ve Dik, 1996; Inci vd., 1998; Bicek ve Deger, 2001; Emre vd., 2001; Inci vd., 2002;

Aktas vd., 2001; Karatepe vd., 2003; Cicek vd., 2004; Aktas vd., 2005a; 2005b; Saraylı vd., 2006; Aktas vd., 2007; Kocabeyoglu, 2009; Sevinc vd., 2013; Ceylan vd., 2021).

Keçilerde mikroskopik yöntem ile *Babesia ovis* türünün yaygınlığı %1-12,12 aralığında tespit edilmiştir. Bu türün mikroskopik prevalansı; İç Anadolu'da %1-12,12, Doğu Anadolu'da ise %3,33 olarak bildirilmiştir (Inci vd., 1998; Inci vd., 2002; Karatepe vd., 2003; Aktas vd., 2005b; Saraylı vd., 2006).

Karadeniz Bölgesi'nde 18 koyun ve 7 keçiye ait kan örneklerinden hazırlanan sürme frotilerin *Theileria* ve *Babesia* türleri yönünden incelendiği bir diğer çalışmada frotilerin mikroskopik muayenesinde *Babesia* türlerine rastlanmamıştır (Altay vd., 2012). Karadeniz Bölgesi'nde yapılan başka bir araştırmada 869 koyun ve 9 keçiye ait kan frotilerinin mikroskopik incelemesinde *Babesia* piroplazmları görülmemiştir (Aydın vd., 2013).

Türkiye'de *B. ovis*'in koyunlarda serolojik teşhisi ilk kez 1979 yılında yapılmıştır (Ozkoç, 1979). Daha sonra yapılan çalışmalarla bu türün seroprevalansı %9,80-80,20 arasında tespit edilmiştir. Koyunlarda *B. ovis*'in seroprevalansı; Karadeniz bölgesi'nde %31,52-71,63, Ege'de %23,58-80,20, Marmara'da %9,80-63,3, Doğu Anadolu'da %45-65,19, Güneydoğu Anadolu'da %27,52-55,68, İç Anadolu'da %23,63-70,90 arasında saptanmıştır (Ozkoc, 1979; Deger, 1990; Cakmak vd., 1991; Duzgun vd., 1991; Sevinc ve Dik, 1996; Duzgun, 1997; Sayin vd., 1997; Dumanli vd., 1997; Aktas vd., 2001; Bicek ve Deger, 2001; Emre vd., 2001; Karatepe vd., 2003; Cicek vd., 2004; Karatepe vd., 2005; Ekici vd., 2012; Sevinc vd., 2013; Ceylan vd., 2021). Niğde yöresinde keçilerde *Babesia ovis*'in prevalansı IFA testi ile %34,78 olarak saptanmıştır (Karatepe vd., 2003). Türkiye'de küçük ruminantlarda görülen kene kaynaklı hastalıklar ile ilgili ilk moleküler çalışma Aktaş vd. (2005a), tarafından yapılmıştır. Ege, Akdeniz, İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerindeki küçük ruminantlarda yapılan moleküler bir çalışmada, bu türün PCR ile yaygınlığı %4,9, RLB ile yaygınlığı %0,4 olarak tespit edilmiştir (Bilgiç vd., 2017). *Babesia ovis*'in sağlıklı koyunlardaki moleküler

prevalansı %0,58-13,15 arasında saptanmış, prevalans değerleri; Akdeniz Bölgesi'nde %5-6,73, Karadeniz'de %0,58-1,66, Ege'de %0,82-6,72, Doğu Anadolu'da %5,43-10,66, Güneydoğu Anadolu'da %2,56-13,15, İç Anadolu'da %2,9-9,9 arasında bulunmuştur (Aktas vd., 2005a; 2005b; Saraylı vd., 2006; Aktas vd., 2007; Altay vd., 2007a; Kocabeyoglu, 2009; Inci vd., 2010; Sevinc vd., 2013; Aydın vd., 2013; Bilgiç vd., 2017; Kose, 2017; Ozubek ve Aktas, 2017a; 2017b; Zhou vd., 2017; Sevinc vd., 2018; Ceylan vd., 2021).

Sevinç vd. (2018), klinik semptom gösteren koyunlarda yaptıkları moleküler çalışmada, %70,81 oranında pozitiflik saptamışlardır. Benedicto ve arkadaşlarının yaptığı bir başka araştırmada, kene ile enfeste koyunlarda %64,8 oranında, keçilerde ise %53,6 düzeyinde *B. ovis* moleküler pozitifliği saptanmıştır (Benedicto vd., 2020).

*Babesia ovis*'in sağlıklı keçilerde moleküler prevalansı %0,43-3 arasında saptanmış, prevalans değerleri; Akdeniz Bölgesi'nde %0,66-1,33, Doğu Anadolu'da %1, Güneydoğu Anadolu'da %0,43, İç Anadolu'da %2-3 arasında bulunmuştur (Saraylı vd., 2006; Aktaş 2007; Kocabeyoglu, 2009; Inci vd., 2010; Ozubek ve Aktas, 2017a; Kose, 2017).

Ozubek ve Aktas (2017a), 18S rRNA gen analizine göre *Babesia* sp. olarak adlandırılan yeni bir *Babesia* izolatını Mersin ilindeki keçilerde %5,74 oranında tespit etmiştir.

*B. motasi* türü Ege Bölgesi'ndeki küçük ruminantlarda RLB tekniği ile %0,1 oranında tespit edilmiştir (Bilgiç vd., 2017). Türkiye'de *B. crassa* türünün varlığı bildirilmiş (Schnittger vd., 2003), bu tür RLB tekniği ile Ege, Akdeniz, Orta, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerindeki küçük ruminantlarda %4,0 oranında (Bilgiç vd. (2017), Burdur ilinde %6,19 oranında tespit edilmiştir (Kose, 2017).

## **1.6. Babesiosisde Bağışıklık**

Babesiosis'e karşı bağışıklıkta sıvısal (humoral) ve hücrel (cellular) faktörler birlikte görev alırlar. Vektör kenenin kan emmesi sırasında verilen sporozoitler, kısa

bir süre dolaşımda bulunurlar. Bu esnada, İmmunoglobulin G (IgG) sporozoitlere bağlanıp nötralize ederek hedef hücrelere girişi engeller. Sporozoitlerin eritrositlere girişini takiben paraziteminin yükselmesiyle birlikte akut babesiosis şekillenir. Parazitemi süresi doğal bağışıklık hücrelerince belirlenir. Makrofajların ve doğal katil hücrelerin (NK) yokluğu kısa süre içinde yüksek bir paraziteminin gelişmesine neden olur. Parazitemi, NK hücrelerce üretilen IFN-  $\gamma$  ile makrofajlarca üretilen TNF- $\alpha$ , NO ve reaktif oksijenler tarafından engellenir. Parazitlerin dejenerasyonunda T lenfositleri ile özellikle de CD4+ ve IFN-  $\gamma$  alt popülasyonları etkilidir (Werling vd., 2004; Inci ve Bişkin, 2007).

Parazitlerin ölümü ve dalak tarafından temizlenmesi parazitemiyi düşürerek hastalığın şiddetini azaltır. Kazanılmış bağışıklık gelişir. Gelişen bağışıklıkta Toll-like reseptörler (TLRs), patojenle ilişkili moleküler kalıplar (PAMPs) olarak isimlendirilen korunmuş moleküler motiflerini tanır ve bu motiflere bağlanırlar. Bunun sonucu olarak doğal bağışıklığın uyarılmasını ve takiben kazanılmış immun yanıtın başlatılmasını sağlarlar. Toll-like reseptörlerden TLR9 ve TLR11'in babesiosise karşı bağışıklıktan sorumlu oldukları bildirilmiştir (Werling vd., 2004; Inci ve Bişkin, 2007).

### **1.7. Babesiosisde Patojenite ve Klinik Bulgular**

Hastalık yetişkin hayvanları daha fazla etkilemekte, perakut, akut, subakut ve kronik seyir göstermektedir. Hayatta kalan hayvanlarda ise subklinik enfeksiyon oluşmaktadır. Klinik bulguların şiddeti, etkenin türüne ve virulans derecesine, vektör kene tarafından inokule edilen sporozoit miktarına, hayvanın yaşı, ırkı ve bağışıklık durumu gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (Purnell, 1981; Levine, 1985; Kaufmann, 1996; Karatepe ve Karatepe, 2016). Küçük *Babesia* türlerinden *B. ovis* oldukça patojendir. Büyük *Babesia* türlerinden *B. motasi* orta derecede patojenite gösterirken, *B. crassa* düşük virulansa sahiptir (Karatepe ve Karatepe, 2016).

Hastalığın patogenezinde, parazitlerin çoğalması sonucu intravasküler hemoliz şekillenmekte ve şiddetli anemik anoreksi gelişmektedir. Gelişen anemi

kemik iliğinde hiperplaziye neden olmaktadır. Kan sulu olup hemoglobinüri ve bilirubin oluşumuna bağlı ikterus gözlenmektedir. Aneminin devam etmesi, deri altında ödem, asites ve kilo kaybına yol açmaktadır (Karatepe ve Karatepe, 2016).

Akut enfeksiyonlarda enfekte eritrositlerin kümelenmesine bağlı mikrovasküler sistemde durgunluk, karaciğer, dalak, böbrek büyümesi ile renklerinde koyulaşma, idrar kesesinin koyu kırmızı idrarla dolması dikkati çekmektedir. Dalakta kırmızı pulpa oldukça kanlanmış olup malpighi cisimcikleri inaktifleşmiştir. Subakut olgularda ise malpighi cisimcikleri orta derecede aktif, eritrosit fagositozu belirgindir. Kronik enfeksiyonlarda, eritrosit fagositozu ve plazma hücre sayısında artış görülmektedir (Karatepe ve Karatepe, 2016).

Koyunlarda akut *B. ovis* enfeksiyonlarında 41-42 derece ateş, durgunluk, iştahsızlık ile tabloya eşlik eden hemoglobinemi, hemoglobinüri, anemi ve sarılık görülmektedir. Hasta hayvanlarda aynı zamanda kuru ve kanlı dışkılama, solunum ve nabız sayısında artış, burun akıntısı, diş gıcırdatması ile titreme dikkati çekmekte, 2-10 gün içinde ölüm şekillenmektedir (Purnell, 1981).

*Babesia motasi* ile akut enfeksiyonda koyunlarda yüksek ateş, anemi, halsizlik ve iştahsızlık görülür. Enfekte eritrositlerin parçalanması 7-10 gün içinde ölüme neden olur. Akut dönemi atlatan hayvanlarda enfeksiyon kronik formda seyreder. Ateş düşer, perifer kanda etkenler azalır ve hayvanlar yem yemeye başlar (Purnell, 1981).

### **1.8. Babesiosisde Teşhis**

Endemik bölgelerde hastalığın görülme sıklığı, vektör kenelerin mevsimsel aktiviteleriyle ilişkili olup, kenelerin aktif olduğu mevsimlerde koyun ve keçilerde ateş, anemi, ikter ve hemoglobinuri gibi klinik semptomların görülmesi hastalığı akla getirmektedir (Soulsby, 1986; Karatepe ve Karatepe, 2016). Hastalığın kesin teşhisinde mikroskopik, serolojik ve moleküler tekniklerden yararlanılmaktadır. Mikroskopik tanı, paraziteminin yüksek olduğu akut enfeksiyonlarda perifer kandan yapılan frotilerin mikroskopik muayenelerinde eritrositler içinde etkenin aranmasına

dayanmaktadır. Ayrıca, ölüm sonrası karaciğer, dalak ve kemik iliğinden yapılan sürme frotilerin mikroskopik incelemesi de yapılabilmektedir. Mikroskopik teşhis ucuz ve kolay uygulanabilir olmasına karşın, etkenler arasında morfolojik benzerliklerin olması güvenilirliğini azaltmaktadır (Karatepe ve Karatepe, 2016; Maharana vd., 2016). Paraziteminin çok düşük olduğu, kronik ve subklinik enfeksiyonlarda kan frotilerinde etken tespiti güçleşmekte, miks enfeksiyonlarda ise morfolojik ayırım zorlaşmaktadır. Hastalığın teşhisinde oluşan antikorları tespit etmek amacıyla Enzim Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), Indirekt Fluoresan Antikor (IFA), Indirekt Hemaglutinasyon (IHA), Komplemant Fikzasyon (CF) ve Latex Aglutinasyon Testi (LAT) gibi serolojik testlerden yararlanılmaktadır (Levine, 1985; Soulsby 1986; Karatepe ve Karatepe 2016; Chung vd., 2017). Serolojik muayenede türler arasında çapraz reaksiyonların görülmesi duyarlılığı ve güvenilirliği daha yüksek olan, aynı zamanda tür identifikasyonu sağlayan PCR, RLB gibi moleküler yöntemlere ilgiyi artırmıştır (Figueroa vd., 1993; Aktas vd., 2005c; Criado-Fornelio vd., 2009; Ramos vd., 2011; Horta vd., 2014; Romero-Salas vd., 2016). Polimeraz Zincir Reaksiyonu hastalık etkenine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primer adı verilen spesifik komplementer oligonükleotitler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri kullanılarak in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan oldukça özgün ve güvenilir bir yöntemdir. Bu yöntem, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotit primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanmaktadır. Reverse line blotting, birden fazla etkenin eş zamanlı olarak tanı ve ayırımlarını sağlamaktadır. Bu teknik, 18S ve/veya 16S rDNA bölgelerinin amplifikasyonu ve elde edilen amplikonların daha önceden bir membrana kovalent olarak bağlanmış tür spesifik problemlerle hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. Problemlerin membranda farklı sıralara dizilmesi ve her bir amplikonun aynı anda tüm problemlerle karşılaşması birden fazla etkene ait gen dizilimlerinin eş zamanlı tanısına ve ayırımına olanak sağlamaktadır (Gubbels vd., 1999; Bişkin vd., 2011; Lempereur vd., 2017).

Babesiosis koyun ve keçilerde benzer bulgularla seyreden theileriosis, trypanosomiasis, anaplasmosis, eperythrozoonosis, basiller hemoglobinuri,

leptospirosis, hemobartonellosis ile kolza ve kronik bakır zehirlenmesinden ayırt edilmesi gerekir (Karatepe ve Karatepe, 2016).

### 1.9. Babesiosisde Korunma ve Tedavi

Küçük *Babesia* türlerinin büyük *Babesia* türlerine nazaran tedaviye daha geç yanıt verdikleri açıklanmıştır. Tedavide kullanılan bazı ilaçların tek dozda parazitemiyi ve premünisyonu ortadan kaldırdığı, bu durumun endemik bölgelerde bulunan hayvanların hastalığa duyarlı hale gelmesine ve reenfeksiyonların ortaya çıkmasına neden olduğu bildirilmiştir (Kuttler,1981; Karatepe ve Karatepe, 2016). Koyun ve keçilerde Babesiosisin tedavisinde imidokarb dipropiyonat yaygın olarak kullanılmaktadır. İmidocarb dipropionat'ın *Babesia ovis* enfeksiyonlarında, deri altı yolla 2 mg/kg, *Babesia motasi* enfeksiyonlarında kas içi 1-3 mg/kg dozda uygulamalarından etkili sonuçlar alınmıştır (De Waal ve Combrink 2006; Mosqueda vd., 2012; Gohil vd., 2013; Hacılarlıoğlu ve Karagenç 2015; Karatepe ve Karatepe, 2016). İmidokarb dipropiyonatın, oksitetrasiklinle birlikte kullanımının, diminazene aseturat ve oksitetrasiklinin kombine kullanımına göre daha başarılı olduğu bildirilmiştir (Hacılarlıoğlu ve Karagenç, 2015). Hasta hayvanlara aynı zamanda sıvı ve vitamin takviyesi yapılmalı, bakım-besleme koşullarına dikkat edilmelidir (Karatepe ve Karatepe, 2016). Günümüzde babesiosise karşı kullanılan spesifik bir aşı bulunmadığından hastalıkla mücadele ilaç kullanımı ve vektör kene kontrolü şeklinde yapılmaktadır. Babesiosisi geçiren koyun ve keçilerde premünisyon şekillenmekte, böyle hayvanlar meradaki keneler için enfeksiyon kaynağı oluşturmaktadır. Parazit, konak ve vektör popülasyonunun dengede olduğu enzootik stabil bölgelerde, oluşan premünisyon duyarlı hayvanları reenfeksiyonlara karşı korumaktadır. Enzootik instabil bölgelerde bulunan hayvanlar ise azalan bağışıklık nedeniyle hastalığa duyarlı hale gelebilmektedir. Endemik bölgelerde hastalıktan korunma amacıyla önerilen premünisyon (immunizasyon) yönteminde, patojenitesi düşük *Babesia* suşlarının inokülasyonunu takiben antibabesial ilaçlar tedavi edici dozun altında verilerek homolog suşlara karşı koruyuculuk sağlanabilmektedir

(Kaufmann, 1996; Florin-Christensen vd., 2014; Karatepe ve Karatepe, 2016). Hastalığa dirençli ırkların geliştirilmesi de diğer korunma yöntemleri arasında yer almaktadır (Florin-Christensen vd., 2014).

#### 1.10. Theileriosisin Tarihçesi ve Taksonomisi

Hastalık ilk defa 1903 yılında Kafkasya sığırlarında Dschunkowsky ve Lush tarafından tespit edilerek Tropikal Piroplasmose olarak isimlendirilmiştir. Bu araştırmacılar sığır eritrositleri içinde tespit ettikleri etkenleri *Piroplasma annulatum* olarak adlandırmışlar, 1907 yılında *Theileria* cins isminin önerilmesi ile *Theileria annulata* olarak isimlendirilmişlerdir (Mimioğlu, 1985; Norval vd., 1992). Daha sonra Sergent ve arkadaşları 1924 yılında, Yakimoff ve Dektereff 1930 yılında, theileriosis ile ilgili çeşitli araştırmalar yapmışlar, tespit ettikleri türlerin genellikle birbirlerinin sinonimleri olduklarını ve *Hyalomma* soyuna ait kenelerce nakledildiklerini bildirmişlerdir (Mimioğlu, 1985; Norval vd., 1992).

*Theileria* türlerinin Systema Natura (2000)'ya göre sınıflandırmadaki yeri aşağıdaki gibidir (Brands, 1989-2005).

Alan: Eukaryota Chatton, 1925

Alem: Protozoa (Goldfuss, 1818) R. Owen, 1858

Alt Alem: Bicilialata

Üst Şube: Alveolata Cavalier-Smith, 1991

Şube: Myzozoa Cavalier-Smith ve Chao, 2004

Alt Şube: Apicomplexa Levine, 1970

Sınıf: Aconoidasida Mehlhorn, Peters ve Haberkorn, 1980

Takım: Piroplasmorida Wenyon, 1926

Aile: Theileriidae du Toit, 1918

Soy: *Theileria* Bettencourt, 1907

#### 1.11. Koyunlarda ve Keçilerde Theileriosis

Koyun ve keçilerde theileriosis, tropik ve subtropik iklim kuşaklarında *Theileria* soyundaki türlerin neden olduğu kene kaynaklı bir hastalıktır. Hastalığa *T. lestoquardi* (*T. hirci*), *T. seperata*, *T. recondita*, *T. ovis*, *Theileria luwenshuni*, *Theileria* sp. China 1, *T. uilenbergi* (*Theileria* sp. China 2), *T. sp. OT1*, *T. sp. OT3* ve *T. sp. MK* türleri neden olmaktadır. *Theileria hirci*, *T. luwenshuni* ve *T. uilenbergi* türleri oldukça patojen olup, *T. sp. OT1*, *T. sp. OT3* ve *T. sp. MK*'nın patojeniteleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu türlerin dışında kalan diğer türler ise hafif enfeksiyon oluşturmaktadır (Uilenberg, 1981; Friedhoff, 1997; Yin vd., 2007; Karatepe ve Karatepe, 2016).

*T. lestoquardi*'nin trofozoitleri, lenfosit ve eritrositlerde gelişim göstermektedir. Eritrositer formlar yuvarlak 0,6-2 µm çapında, oval veya çubuk şeklinde 1,6 µm uzunluğundadır. Eritrositlerde ikili veya dörtlü formlara da rastlanabilmektedir. Dalak ve lenf düğümlerinin lenfositlerinde yaygın olarak bulunan merontlar ortalama 8 µm çapında olup 1-80 adet granül içermektedir. Eritrositler içinde gelişen piroplasmik formlar ortalama 1-2 µm çapındadır (Taylor vd., 2016).

*Theileria recondita*'nın piroplasmik formları genellikle yuvarlak veya çubuk şeklindedir. Çubuk formları 2,09 µm uzunlukta, yuvarlak formları 1,22 µm çapındadır (Alani ve Herbert, 1988).

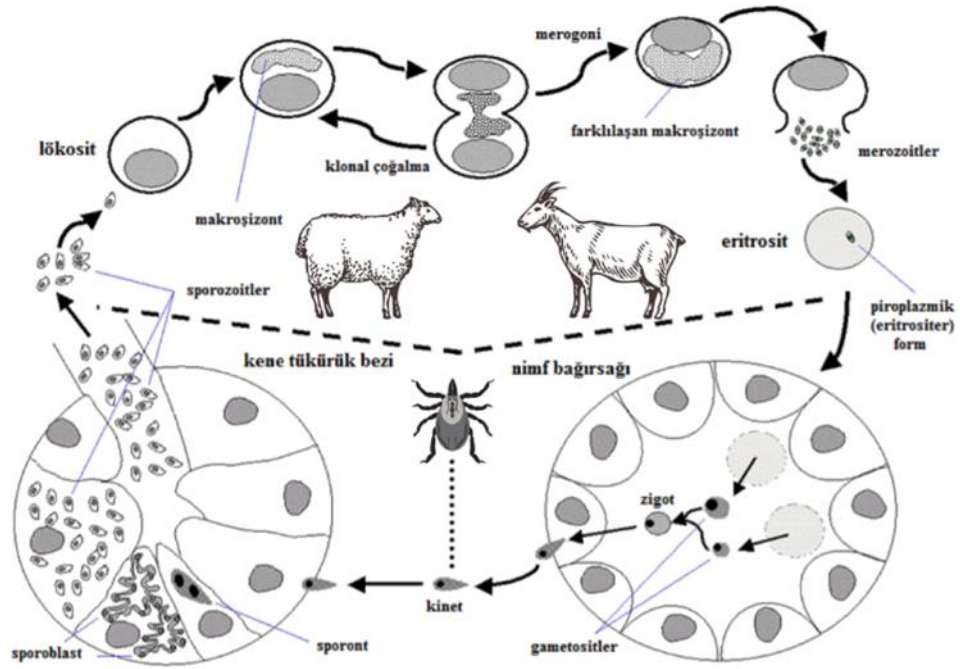
*Theileria ovis* şekil ve büyüklük bakımından *T. lestoquardi*'ye benzemektedir. Lenfosit ve eritrositlerde genellikle yuvarlak, nadiren oval ya da çubuk şeklinde görülebilmektedir. Oval formları 0,6 -2 µm çapında, çubuk formları ortalama 1,6 µm uzunluktadır. Tür ile enfekte dalağı çıkarılmamış hayvanlarda şizontların tespiti güçleşmekte, düşük parazitemi nedeniyle de eritrositer formlara ender rastlanmaktadır (Taylor vd., 2016).

*Theileria uilenbergi* ve *T. luwenshuni* türleri morfolojik olarak *T. lestoquardi*'ye benzemektedir. Morfolojik ve biyolojik benzerlik gösteren her iki tür filogenetik yönden farklıdır (Yin vd., 2008).

*Theileria seperata*'nın piroplasmik formlarında veil adı verilen oval, perde benzeri yapının bulunması *T. ovis*'den ayrımını mümkün kılmaktadır (Kaufmann, 1996).

#### **1.12. *Theileria* Türlerinin Yaşam Döngüsü**

Zorunlu hücre içi parazit olan *Theileria* türlerinin, şizogoni dönemi koyun ve keçilerde, gemetogoni ile sporogoni dönemleri ise vektör kenede geçmektedir (Şekil 1.2). *Theileria* türleri vektör kenelerce transstadial olarak nakledilmekte, aç larva veya nimf enfekte bir konaktan kan emme esnasında etkeni alarak gömlek değiştirdikten sonra aç nimf veya erişkin aşamada bir diğer konağa verilmektedir. *Theileria* türlerinde vektör kenelerce transovaryal nakil olmadığından, erişkin dönemde etkeni alan kene, başka bir konağa etkeni nakledememektedir (Soulsby, 1986; Shaw, 2003).



**Şekil 1.2:** *Theileria* türlerinin yaşam siklusu-<http://www.theileria.org/ahdw/background.htm> (İnt. Kyn. 1).

### 1.12.1. Omurgalı Konakta Gelişim

Enfekte kene kan emme esnasında tükürük salgısı ile sporozoitleri duyarlı hayvana 4-8 gün sonra verir (Levine, 1985; Shaw, 2003; Karatepe ve Karatepe, 2016). Kan dolaşımına geçen, yaklaşık 1  $\mu\text{m}$  büyüklüğündeki sporozoitler, oval yapılı, tek çekirdekli ve hareketsizdirler. Kenenin kan emdiği yere yakın lenf yumrularında bulunan lenfositlere girerler. Konak hücreye girişi sağlayan apikal kompleks unsurlarından olan konoid, mikronem, mikrotübül çemberi ve subpelikular iç membran kompleksinden yoksundurlar. Konak hücreye giriş; bağlanma, parazit ve konak hücre membranları arasında fermuar benzeri bir yapının oluşması, özümseme ve parazitin konak hücre sitoplazmasına alınması aşamalarından oluşur. Sporozoitler konak hücre sitoplazmasında parazitofor vakuol oluşturmaksızın serbest kalır, gelişerek trofozoit halini aldıktan sonra şizogoni yoluyla çoğalarak Koch cisimcikleri

olarak da bilinen makroşizontları oluştururlar. Makroşizontlar 10-20 arasında çekirdeğe sahip olup birkaç bölünme siklusundan sonra mikroşizontlar meydana gelir. Mikroşizont çekirdeklerinin her biri merozoitleri oluşturur. Parazitin oluşturduğu lenfoproliferatif etki ile parazit ve lenfositler eş zamanlı olarak bölünür. Bunun neticesinde kanser hücrelerine benzer şekilde metastaz oluşturarak diğer doku ve organlara yayılır (Morrison vd., 1996; Shaw, 1997; Shaw, 2003; Hermann ve Dobbelaere, 2006). Konak hücrenin parçalanması ile dolaşıma geçen merozoitler, eritrositlere girerek yuvarlak, oval, virgül şeklinde olabilen piroplasmik formları oluştururlar. Serbest kalan merozoitlerin eritrosit içine girişi sporozoitlerin lenfositler içine girişine benzer şekilde olur. Parazit ve eritrosit membranlarının oluşturduğu fermuar benzeri mekanizmayla eritrosit içine alınan merozoitler rhoptrilerce salgılanan enzim sayesinde konak hücreyi irkiltmeden gelişimini sürdürür. Salgılanan bu enzim aynı zamanda konak hücreye ait algaçları inaktive ederek savunma mekanizmalarını etkisiz hale getirir (Shaw, 2003).

Piroplasmik formlara vektör kenenin sporozoitleri vermesinden 8-10 gün sonra eritrositler içinde rastlanır. Piroplasmik formlar eritrosit içinde aseksüel olarak ikiye bölünerek çoğalır (Levine, 1985; Shaw, 2003; Karatepe ve Karatepe, 2016).

### **1.12.2. Vektör Kenedeki Gelişim**

Vektör kenelerin enfekte koyun ve keçiden kan emmeleri esnasında aldıkları piroplasm formlarından özellikle halka formunda olanlar kenenin bağırsağında gametogoni yoluyla çoğalarak iplik şeklinde mikrogametleri ve yuvarlak makrogametleri meydana getirir. Mikrogamet ile makrogamet birleşmesi sonucu oluşan zigot mide duvarını delerek hemolenfe geçer. Daha sonra uzayarak ookinet halini alır ve tükürük bezlerinin Tip I ve Tip II asini hücrelerinde sporogoni yoluyla çoğalarak sporoblastları meydana getirir. Vektör kenenin gömlek değiştirip yeni bir konağı enfekte etmesiyle birlikte sporogoni yoluyla çoğalma sonucunda tükürük bezi hücrelerinde sporozoitler oluşur. Oluşan sporozoitlerin kan emme süresince konağa verilmesi ile enfeksiyon nakledilmiş olur (Levine, 1985; Shaw, 2003; Karatepe ve Karatepe, 2016).

### 1.13. Epidemiyoloji

Koyun ve keçilerde theileriosis, vektör kene aktivitesine bağlı olarak genellikle Mart-Eylül ayları arasında görülmekte, vektör keneler ile yalnızca transstadial olarak nakledilmektedir. Transstadial nakilde vektör kene kan emerken aldığı etkeni, bir sonraki gelişim döneminde duyarlı hayvanlara vermektedir (Karatepe ve Karatepe, 2016). Hastalığın epidemiyolojisinde önemli bir role sahip olan vektör kenelerin dağılımında iklim, toprak yapısı, bitki örtüsü ve yükselti gibi faktörler etkili olmaktadır (İça ve Özkan, 2015).

*Theileria ovis*'in vektörleri, Akdeniz bölgesinde *Rhipicephalus bursa*, Afrika'da *R. evertsi*, *T. lestoquardi*'nin vektörleri *R. bursa* ve *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *T. recondita*'nın vektörü *Haemaphysalis punctata*, *T. separata*'nın vektörü *R. evertsi*, *T. luwenshuni* ve *T. uilenbergi*'nin vektörleri *Hae. qinghaiensis* ile diğer *Haemaphysalis* türleri olarak açıklanmıştır (Levine, 1985; Soulsby, 1986; Kaufmann, 1996; Karatepe ve Karatepe, 2016).

### 1.14. Türkiye'de Koyun ve Keçilerde Theileriosisın Yayılışı

Türkiye'de *Theileria* türlerinin varlığı ilk olarak mikroskopik bakı daha sonra da serolojik yöntemler ve moleküler teknikler ile araştırılmıştır. Koyunlarda *Theileria ovis* türüne ilk kez 1931 yılında Lestoquard ve Ekrem tarafından rastlanmıştır (Goksu, 1967). Türkiye'de yapılan mikroskopik çalışmalarda *Theileria ovis*, koyunlarda %1,44-52,71 arasında bulunmuştur (Goksu, 1967; Hoffmann vd., 1971; Guralp vd., 1975; Altay vd., 2005; Aktas vd., 2005a; Sayın vd., 2009). Guralp vd. (1975), Marmara bölgesindeki sağlıklı koyunlarda *T. ovis*'in mikroskopik prevalansını %1,44 oranında tespit etmiştir. Doğu Anadolu bölgesindeki sağlıklı koyunlarda yapılan mikroskopik çalışmalarda *T. ovis* %19,35 (Altay vd., 2005) ve %24,39 oranında saptanmıştır (Aktas vd., 2005a). Sayın vd. (2009), koyunlarda *Theileria ovis*'i mikroskopik yöntemle İç Anadolu'da %38,55, Doğu Anadolu'da %18,42, Güneydoğu Anadolu'da %41,38 oranında tespit etmiştir. Aynı çalışmada bu

tür İç Anadolu bölgesindeki keçilerde %8,20 oranında saptanmıştır (Sayın vd., 2009). *Theileria ovis* sağlıklı ve klinik olarak şüpheli küçük ruminantlarda mikroskopik olarak İç Anadolu'da %18,26, Doğu Anadolu'da %52,71 oranında tespit edilmiştir (Goksu, 1967; Aydın ve Dumanlı, 2019).

*Theileria ovis*'in küçük ruminantlarda serolojik prevalansına yönelik tek çalışma Sayın vd. (2009), tarafından yapılmıştır. Seroprevalans değerleri, İç Anadolu'da %8,20, Güneydoğu Anadolu'da %10,71 olarak belirlenmiştir (Sayın vd., 2009).

Moleküler tekniklerin kullanıldığı çeşitli çalışmalarda *T. ovis*'in koyunlardaki yaygınlığı %0-79,69 arasında, keçilerde ise %0,3-22,6 arasında tespit edilmiştir. Bölgelere göre koyunlarda *T. ovis*'in görülme sıklığı; Akdeniz'de %30,56-79,69, Güneydoğu Anadolu'da %0-57,45, Doğu Anadolu'da %24,79-58,79, İç Anadolu'da %42-56,80, Karadeniz bölgesinde %27,34-34,64 arasında bulunmuştur. Sağlıklı keçilerde yapılan moleküler çalışmalarda ise; İç Anadolu'da %3,88-18,08, Karadeniz'de %2,74-10,04, Doğu Anadolu'da %11,27-13,48, Güneydoğu Anadolu'da %0-22,6, Akdeniz'de %0,3-9,6 aralığında bildirilmiştir (Aktas vd., 2005b; Altay vd., 2005; Saraylı vd., 2006; Altay vd., 2007a; Altay vd., 2007b; Kocabeyoglu, 2009; Inci vd., 2010; Altay vd., 2012; Aydın vd., 2013; Altay vd., 2017; Bilgiç vd., 2017; Kose, 2017; Ozubek ve Aktas, 2017a; 2017b; Zhou vd., 2017; Aydın, 2019; Ceylan vd., 2021). Bu tür Doğu Anadolu'da sağlıklı koyunlarda PCR tekniği ile %54,03 (Altay vd., 2005) ve %43,29 oranlarında saptanmıştır (Aktas vd., 2005b). *Theileria ovis* RLB yöntemiyle küçük ruminantlarda İç Anadolu bölgesinde %33,9 (Inci vd., 2010) ve %37,6 (Saraylı vd., 2006), Karadeniz bölgesinde koyunlarda %18,90 (Altay vd., 2012), keçilerde %28,99 oranlarında (Aydın vd., 2013), Ege, Akdeniz, İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu'da %60 (Bilgiç vd., 2017), Akdeniz bölgesinde koyun ve keçilerde %17 oranında tespit edilmiştir (Ozubek ve Aktas, 2017a).

*Theileria lestoquardi* Türkiye'de yalnızca mikroskopik bakıyla (%16,9) saptanmıştır (Hoffmann vd., 1971). *Theileria uilenbergi*, *T. luwenshuni*, *T. separata*,

*Theileria* sp. OT1 türlerinin Türkiye’deki varlığı ilk kez Bilgiç vd. (2017), tarafından açıklanmıştır. Küçük ruminantlarda yapılan bu çalışmada RLB ile *T. uilenbergi* %2,2, *T. luwenshuni* ve *T. separata* %0,10 oranında, PCR ile *T. luwenshuni* en yüksek %23,8 oranında tespit edilmiştir (Bilgiç vd., 2017).

Küçük ruminantlarda moleküler tekniklerle teşhis edilemeyen izolatlardan *Theileria* sp. MK genotipinin yaygınlığı %0,3-2,59 arasında (Altay vd., 2007a; Altay vd., 2012; Aydın vd., 2013; Altay vd., 2017; Bilgiç vd., 2017; Ozubek ve Aktas, 2017a); *Theileria* sp. OT3 genotipinin yaygınlığı ise %0,2-4,27 arasında tespit edilmiştir (Altay vd., 2007a; Altay vd., 2012; Aydın vd., 2013; Altay vd., 2017; Bilgiç vd., 2017; Aydın, 2019). *Theileria* sp. MK genotipi Karadeniz bölgesinde sağlıklı küçük ruminantlarda %0,99 (Altay vd., 2012) ve %0,62 oranlarında bulunmuştur (Aydın vd., 2013). *Theileria* sp. OT3 izolatına sağlıklı küçük ruminantlarda İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Karadeniz bölgelerinde rastlanmıştır (Altay vd., 2007a; Altay vd., 2012; Aydın vd., 2013; Altay vd., 2017; Bilgiç vd., 2017; Aydın, 2019).

Adana, Gaziantep ve Adıyaman illerindeki küçük ruminantlarda RLB ve Nested PCR-restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP) kullanılarak yapılan bir çalışmada *T. annulata* keçilerde %2,11, koyunlarda ise %3,56 oranında tespit edilmiştir (Ozubek ve Aktaş, 2017a).

#### **1.15. Theileriosisde Bağışıklık**

Enfeksiyona karşı bağışıklığın oluşumunda hem humoral hem de hücrel immun sistem etkilidir. Vektör kenenin beslenmesi sırasında dolaşıma verilen sporozoitlere karşı nötralizasyon fonksiyonuyla humoral yanıt oluşmaktadır. Sporozoitlerin konak hücreye girişi çok kısa sürede gerçekleştiğinden korumanın oluşması için yüksek oranlarda antikor titresine gereksinim duyulmaktadır. Doğal enfeksiyonlarda bu titreler tekrarlanan enfekte kene enfestasyonları ile sağlanabilmektedir. Antikorların yanı sıra aktive edilmiş makrofajlar tarafından üretilen nitrik oksit (NO)’in in vitro olarak sporozoitlerin konak hücreye girişini inhibe ettiği açıklanmıştır. Şizontlar ile

enfekte hücrelere karşı hücreyel yanıt ön plana çıkmaktadır. Doğal öldürücü hücreler (NK), makrofajlar ve T-lenfositleri (CD4+ T-hücreleri ve sitotoksik T-lenfositleri) kazanılmış aktif bağışıklıkta önemli bir rol oynamaktadır. Enfekte ve enfekte olmayan hücrelerce üretilen sitokinler de hastalığın patogeneğinde önemli bir etkiye sahiptir. (Visser vd., 1995; Karagenç ve Eren, 2007).

#### **1.16. Theileriosisde Patojenite ve Klinik Bulgular**

Koyun ve keçilerde *T. lestoquardi*, *T. luwenshuni* ve *T. uilenbergi* patojen olup klinik theileriosise, apatojen olan *T. ovis*, *T. separata* ve *T. recondita* türleri ise subklinik theileriosise neden olmaktadır (Levine, 1985; Soulsby, 1986; Kaufmann, 1996; Karatepe ve Karatepe, 2016). Hastalık genç kuzu ve oğlaklarda maternal antikorlar nedeniyle hafif seyretmektedir. Endemik bölgelerde klinik theileriosis %100'e varan ölümlere yol açmaktadır (Levine, 1985; Soulsby, 1986; Kaufmann, 1996; Karatepe ve Karatepe, 2016). Patojen türlerin neden olduğu enfeksiyonlar akut, subakut ya da kronik formda seyretmektedir. Akut formda 4-5 gün süren yüksek ateş, iştahsızlık, burun akıntısı, mukozalarda solgunluk, sarılık, kanlı ishal, nabız hızında artış, solunum güçlüğü, dalak, yüzeysel lenf yumruları ve böbreklerde büyüme ile geçici hemoglobinuri görülmektedir. Subakut formda klinik belirtiler daha hafiftir. Akut ya da subakut formun devamında kronik form gelişebilir ve iyileşme ile sonuçlanabilir (Levine, 1985; Kaufmann, 1996; El Imam ve Taha, 2015; Karatepe ve Karatepe, 2016).

#### **1.17. Theileriosisde Teşhis**

Hastalığın teşhisi anemnez bilgilerinin değerlendirilmesi, klinik semptomların gözlenmesi, mikroskopik muayene ile serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılmaktadır (Levine, 1985; Soulsby, 1986). Mikroskopik muayene, en sık kullanılan yöntemlerden biri olup perifer kandan ve lenf yumrusu punksiyonundan hazırlanan frotilerin Giemsa ile boyanması esasına dayanmaktadır. Giemsa boyalı perifer kan frotilerinde eritrositlerde piroplasm formlar, lenf punksiyonu yapılarak hazırlanan frotilerde ise lenfositler içinde şizontlar aranmaktadır (Soulsby, 1986;

Kaufmann, 1996; Karatepe ve Karatepe, 2016). Mikroskopik muayenede, latent enfeksiyonlarda etkene rastlanamaması, *T. ovis* ve *T. lestoquardi*'nin morfolojik benzerlik göstermesi gibi durumlar teşhisi güçleştirmektedir (Uilenberg, 1981; Karatepe ve Karatepe, 2016). Serolojik teşhiste *Theileria* türlerine karşı oluşan antikorların saptanması amacıyla ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test), sELISA (Slide Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IHAT (Indirect Hemagglutination Test), CFT (Complement Fixation Test), LAT (Latex Agglutination Test), RIA (Radioimmunoassay) ve immunokromatografik strip (ICS) gibi testler kullanılmaktadır. Serolojik yöntemlerin de türler arası çapraz reaksiyon verme, geçirilmiş ya da latent enfeksiyonun ayırımındaki güçlükler gibi dezavantajları bulunmaktadır (Bakheit vd., 2006; Lu vd. 2015; Karatepe ve Karatepe, 2016). Nükleik asitlere dayalı yöntemler immünite düzeyi ya da geçirilmiş enfeksiyondan etkilenmeksizin, morfolojik olarak benzer veya aynı antijenik epitoplara sahip türlerin ayırımında yüksek duyarlılıkları ile hassas bir tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Multiplex PCR, Real-Time PCR, PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Reverse Line Blotting (RLB) ve Loop Mediated Amplification (LAMP) gibi yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (Gubbels vd., 1999; Bami vd., 2009; Bilgiç vd., 2010; Bişkin vd. 2011; El Imam ve Taha, 2015).

#### **1.18. Theileriosisde Korunma ve Tedavi**

Hastalığın etiyolojik tedavisinde parvaquone 10 mg/kg dozda kas içi enjeksiyonla 2 veya 4 gün aralıklarla 2 defa uygulanır. Türkiye'de yaygın olarak kullanılan buparvaquone 2,5 mg/kg dozda kas içi enjeksiyonla 2 veya 4 gün ara ile iki kez tatbik edilir. Halofuginon 1,2 mg/kg dozda 500 ml sıvı ile peros yolla kullanılır (Karaer ve Nalbantoğlu, 2005; Karatepe ve Karatepe, 2016). Destekleyici tedavide demir bileşikleri, karaciğer preparatları, vitamin B kompleksleri ile kalbi takviye edici ilaçlar önerilmektedir. Hastalıktan korunmada uygun akarisitlerle kene mücadelesi yapılması, kemoterapi, immünizasyon ile bakım-besleme şartlarının iyileştirilmesi ön plana çıkmaktadır (Mimioğlu vd., 1969). Hastalığın bulunmadığı bölgelerden getirilen kötü huylu theileriosise duyarlı hayvanların, hastalığın sık görüldüğü bölgelere sokulmamaları önem taşımaktadır (Kaufmann, 1996; Karatepe

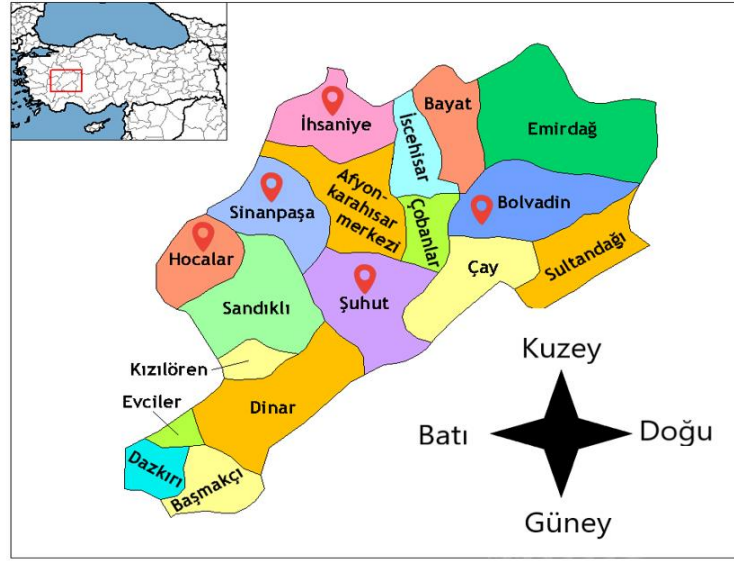
ve Karatepe, 2016). İran, Irak ve Sudan'da *T. lestoquardi* için geliştirilen hücre bazlı aşılardan, küçükbaş theileriosisine karşı etkili bir koruma sağladığı bildirilmiştir (Ahmed vd., 2013; El Imam ve Taha, 2015).

## **2. MATERYAL VE METOT**

### **2.1. Saha çalışmaları**

#### **2.1.1. Araştırma merkezleri ve hayvan materyali**

Bu çalışma 2019 yılı Mart–Kasım ayları arasında koyun ve keçi popülasyonunun yoğun olduğu bilinen Afyonkarahisar iline bağlı Hocalar, Şuhut, Sinanpaşa, Bolvadin ve İhsaniye ilçelerindeki koyun ve keçiler üzerinde yürütülmüştür (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1:** Araştırma merkezleri ve konumları

Araştırma merkezlerinin her birinden, babesiosis ve theileriosis semptomları göstermeyen, farklı sürülerden olmak üzere 1 yaş üstü 40 adet pırlak ırkı koyun ve 40 adet kıl keçisi seçilerek toplamda 400 adet hayvan çalışmaya dahil edilmiştir. Kan alınan ve kene toplanan hayvan türlerinin araştırma merkezlerine göre dağılımı Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.1:** Hayvan türlerinin araştırma merkezlerine göre dağılımı

| Araştırma merkezleri | Koyun Sayısı | Keçi Sayısı | Toplam |
|----------------------|--------------|-------------|--------|
| Sinanpaşa            | 40           | 40          | 80     |
| Hocalar              | 40           | 40          | 80     |
| Şuhut                | 40           | 40          | 80     |
| Bolvadin             | 40           | 40          | 80     |
| İhsaniye             | 40           | 40          | 80     |
| Toplam               | 200          | 200         | 400    |

---

Sinanpaşa, 38,744° kuzey enlemi ile 30,243° doğu boylamları arasındadır. İl merkezine 33 km uzaklıkta ve ortalama 1.121 metre yüksekliktedir. Yaz mevsimi ılık ve kurak geçerken, kışlar soğuk ve karlıdır. Yıllık ortalama yağış 539 mm'dir. En yağmurlu ay aralık ayı olup, ortalama yağış miktarı 37 mm'dir. İlçede en az yağmur yağan ay ağustos olup, ortalama yağış miktarı 10 mm'dir. En sıcak ay temmuz ayı olup, bu ayda ortalama yüksek sıcaklık 28°C iken en düşük sıcaklık 14°C'dir. En soğuk ay ocak ayı olup, bu ayda ortalama düşük sıcaklık -4°C iken en yüksek sıcaklık 4°C'dir (MGM, 2020).

Hocalar, 38,578° kuzey enlemi ile 29,968° doğu boylamları arasındadır. İl merkezine 113 km uzaklıkta ve ortalama 1.075 m yüksekliktedir. Hocalar ilçesi orman ve fundalıklarla kaplıdır. Yıllık ortalama yağış 462 mm'dir. Yaz mevsimi ılık ve kurak geçerken, kışlar soğuk ve karlıdır. Hocalar ilçesinde en çok yağmur görülen ay aralık olup, ortalama yağış miktarı 44 mm'dir. İlçede en az yağmur görülen ay ağustos olup, ortalama yağış miktarı 10 mm'dir. En sıcak ay temmuz ayı olup, bu ayda ortalama yüksek sıcaklık 29°C iken en düşük sıcaklık 14°C'dir. En soğuk ay ocak ayı olup, bu ayda ortalama düşük sıcaklık -3°C iken en yüksek sıcaklık 4°C'dir. Hocalar ilçesinde gündüz gece arasındaki sıcaklık farklılığı, diğer ilçelere göre yüksektir (İnt, Kyn. 2; MGM, 2020).

Şuhut, 38,531° kuzey enlemi ile 30,546° doğu boylamları arasındadır. İl merkezine 29 km uzaklıkta ve ortalama 1.138 m yüksekliktedir. Yaz mevsimi ılık ve kurak geçerken, kışlar soğuk ve karlıdır. Yıllık ortalama yağış 369 mm'dir. İlçede en yağmurlu ay nisan olup, ortalama yağış miktarı 37 mm'dir. İlçede en az yağmur yağan ay ağustos olup, ortalama yağış miktarı 11 mm'dir. En sıcak ay temmuz ayı olup, bu ayda ortalama yüksek sıcaklık 28°C iken en düşük sıcaklık 14°C'dir. En soğuk ay ocak ayı olup, bu ayda ortalama düşük sıcaklık -4°C iken en yüksek sıcaklık 4°C'dir (MGM, 2020).

Bolvadin, 38,711° kuzey enlemi ile 31,049° doğu boylamları arasındadır. İl merkezine 52 km uzaklıkta ve 995 m yüksekliktedir. İlçedeki otlak alanlar, daha çok

dağlık kesimlerin güney yamaçlarında yoğunlaşırken, orman alanları fundalık şeklindedir. Yıllık ortalama yağış 369 mm'dir. İlçede en yağmurlu ay nisan ayı olup, ortalama yağış miktarı 33 mm'dir. İlçede en az yağmur görülen ay ağustos olup, ortalama yağış miktarı 9 mm'dir. En sıcak ay temmuz ayı olup, bu ayda ortalama yüksek sıcaklık 29°C iken en düşük sıcaklık 15°C seviyesindedir. En soğuk ay ocak ayı olup, bu ayda ortalama düşük sıcaklık -3°C iken en yüksek sıcaklık 4°C'dir (Alcı, 2007; MGM, 2020).

İhsaniye, 39,029° kuzey enlemi ile 30,416° doğu boylamları arasındadır. İl merkezine 36 km uzaklıkta ve 1.101 m yüksekliktedir. Yıllık ortalama yağış 359 mm'dir. En yağmurlu ay nisan ayı olup, ortalama yağış miktarı 35 mm'dir. En az yağmur yağın ay ağustos olup, ortalama yağış miktarı 10 mm'dir. En sıcak ay temmuz ayı olup, bu ayda ortalama yüksek sıcaklık 28°C iken en düşük sıcaklık 14°C'dir. En soğuk ay ocak ayı olup, bu ayda ortalama en düşük sıcaklık -4°C iken en yüksek sıcaklık 4°C'dir (MGM, 2020). İlçede koyun ve keçi yetiştiriciliği diğer ilçelere kıyasla antihijyenik koşullarda yapılmaktadır.

## **2.2. Kan Örneklerinin Alınması ve Kenelerin Toplanması**

Rastgele seçilen sağlıklı 200 koyun ve 200 keçinin *vena jugularis*'inden tekniğine uygun olarak 5 ml'lik steril EDTA'lı (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate) tüplere alınan kan örneklerinin her birine protokol numarası verilmiştir. Kan örneklerinden mikroskobik inceleme için preparatlar hazırlandıktan sonra analizleri yapılmaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Kan örneği alınan koyun ve keçilerin kuyruk altı, perineum, scrotum, meme, prepisyum, kulak içi, boyun altı ve sternum bölgeleri kene enfestasyonu yönünden muayene edilmiştir. Bulunan keneler kapağı delikli tüplere alınarak laboratuara getirilmiştir.

## **2.3. Laboratuvar Çalışmaları**

### **2.3.1. Mikroskobik muayene**

EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden her bir hayvan için sürme frotiler hazırlanmıştır. Frotiler metil alkolde 5 dakika tespit edildikten sonra %5'lik Giemsa boya solusyonu ile 40 dakika süreyle boyanmıştır. Boyanan preparatlar hafif akan çeşme suyu altında yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Preparatlar, kuruduktan sonra ışık mikroskobu altında immersiyon yağı damlatılarak x100'lük objektif ile en az 200 mikroskop sahası olacak şekilde *Babesia* ve *Theileria* türlerinin piroplasmik formları yönünden incelenmiştir. Çalışmanın moleküler kısmı Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmüştür.

#### **2.4. Kenelerin Tür Teşhisleri ve Yumurtlatılması**

Kan örneklerinin alındığı hayvanlardan toplanan keneler morfolojik özelliklerine göre stereo mikroskopta incelenmiş, tür tespitleri ilgili kaynaklardan yararlanılarak yapılmıştır (Merdivenci, 1969; Aydın, 1994; Estrada-Pena vd., 2004). Doymuş erişkin dişi keneler tür tespitleri yapıldıktan sonra 28°C ve %85 nispi nem içeren etüvde yumurtlamaya bırakılmıştır. Yumurta kümeleri DNA izolasyonu gerçekleşinceye kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

#### **2.5. Genomik DNA İzolasyonu**

Genomik DNA izolasyonu DNA izolasyon ticari kiti (A.B.T.<sup>TM</sup> DNA Purification Kit) kullanılarak ilgili kitin protokolüne göre yapılmıştır. Kan örnekleri oda ısısında çözdürüldükten sonra homojenliği sağlamak amacıyla, 15-20 saniye vorteks işlemine tabi tutulmuştur. Yumurta kümelerinden DNA izolasyonu kit protokolüne göre yapılmış; sıvı azot, 180 µl digestion buffer ve 20 µl Proteinaz K kullanılarak 56°C sıcaklığa ayarlı benmaride 1 gece bekletilmiştir. Genomik DNA izolasyonunun kontrolü amacıyla numunelerin nanodrop spektrofotometre (NanoDrop1 ND-2000 UV/vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, USA) cihazında µl'deki DNA miktarları (ng/mL) tespit edilmiştir.

### 2.5.1. Referans DNA Örnekleri

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi moleküler parazitoloji laboratuvarında daha önce izole edilen ve sekans analizi ile kontrolü yapılmış DNA örnekleri pozitif

kontrol olarak çalışmada kullanılmıştır. Negatif kontrol için 3 aylık kuzudan alınan kandan DNA izolasyonu yapılmış ve bu DNA RLB-F2/RLB-R2 primerleri kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu ve sürme froti sonuçları negatif çıkan örnekler *Theileria* ve *Babesia* parazitleri yönünden negatif kabul edilmiştir. Çalışma süresince yapılan PCR ve RLB gibi moleküler tekniklerde bu örnek negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

### 2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Sonuçların Görüntülenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu Touchdown PCR şeklinde Thermo Hybaid PX2 (Hybaid) marka cihaz kullanılarak yapılmıştır. DNA amplifikasyonu için 25 µl hacimli reaksiyon içeriği kullanılmıştır. Her bir reaksiyonda pozitif ve negatif kontrol DNA örnekleri çalışılmıştır. Elektroforez işlemi PCR sonunda amplifiye olan DNA örneklerinden 5 µl alınarak, agaroz jelde Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tampon solüsyonu kullanılarak jel tankında 90 voltta bir saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra jel, ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dk. boyandıktan sonra, UV (Ultraviyole) transillüminatörde spesifik bantların varlığı açısından değerlendirilmiştir. Touchdown PCR şartları Çizelge 2.2’de ve hazırlanan reaksiyon içeriği Çizelge 2.3’de gösterilmiştir. Kalan PCR ürünleri ise 20 µl Reverse Line Blotting analizinde kullanılmak üzere +4°C’de muhafaza edilmiştir.

**Çizelge 2.2:** Touchdown PCR için gerekli şartlar

| <b>İşlem</b>  | <b>Isı (°C) – Süre(sn.)</b> | <b>Döngü Sayısı</b> |
|---------------|-----------------------------|---------------------|
| 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    | 72-600                      | 1                   |
| Bekletme      | 4 °C'de                     |                     |

**Çizelge 2.3:** PCR Reaksiyon içeriği

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

## 2.7. RLB Membranın Hazırlanışı

Analiz için kullanılacak oligonükleotitler Biodyne-C membran üzerine ilgili literatürlere uygun olarak bağlanmıştır (Gubbels vd., 1999; Georges vd., 2001). Membran 10 dk. boyunca oda sıcaklığında 10 mililitre %16 EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethyloamino- propyl)carbodiimide) ile etkinleştirilerek distile suda yıkandıktan sonra MN45 Miniblotter üzerine yerleştirilmiştir. Probların sulandırılma işlemi 50-1200 pmol/150µl oranında, 500 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH: 8,4) kullanılarak yapılmıştır. Problar membran üzerinde kalan sıvılar çekildikten sonra yüklenmiştir. İlk ve son kanallara 2X SSPE ile 1/100 oranında seyreltilmiş çini mürekkebi, kalan kanallara ise 500 mM NaHCO<sub>3</sub> ile sulandırılmış problar dikkatlice yerleştirilmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk. inkübasyona tabi tutulan membran üzerindeki sıvılar aspire edilmiştir. Membran miniblotter üzerinden çıkarılarak, 100 mM NaOH ile 10 dk. boyunca inaktive edilmiş, kullanıma hazır hale gelmesi için 2X SSPE / %0,15 SDS ile 60°C’de 5 dk. yıkanmıştır.

## 2.8. Reverse Line Blotting

Thermal cycler cihazında denatürasyon işlemi için PCR ürünlerinden 20 µl alınmış, 2X SSPE / %0,1 SDS ile 150 µl olacak şekilde sulandırılan ürünler 100°C’ de 10 dk. tutularak işlem tamamlanmıştır. Cihazdan çıkarılan ürünler hızlıca buz akülerinde soğutularak DNA iplikçiklerinin birleşmesine engel olunmuştur. Membran 5 dk. boyunca 2X SSPE/%0,15 SDS’de yıkanarak miniblottre konulmuştur. Membranda kalan sıvılar uzaklaştırılarak 150 µl PCR ürünlerinin yüklenmesi gerçekleştirilmiştir. Miniblotter bir saat boyunca 42°C’de inkübasyonu sağlamak için düz bir zeminde bekletilmiştir. Sürenin sonunda kalan sıvılar uzaklaştırılarak membran 10 dk. boyunca 2X SSPE/%0,5 SDS solüsyonunda 52°C’de iki kez yıkanmıştır. Membran yıkandıktan sonra 10 ml peroksidad ile işaretli, 1: 4000 oranında 2X SSPE/%0,5 SDS ile sulandırılmış olan streptavidin-POD Konjugat kimyasalı kullanılarak 42°C’de 30 dk. boyunca hafif bir şekilde çalkalanarak inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyondan sonra 42 °C’de 10 dk. boyunca iki kez 2X SSPE/%0,5 SDS ile, ayrıca 2X SSPE ile 5 dk. boyunca oda sıcaklığında iki kez yıkanmıştır. Yıkamalardan sonra 1 dk. boyunca 10 ml ECL sıvısı kullanılarak düz bir zeminde inkübe edilmiştir. Membranın üzeri daha sonra asetatla örtülerek üzerindeki hava kabarcıkları alınmış, uygun bir karanlık ortamda Kodak Biomax Light Film kullanılarak sinyallerin gücüne göre 30 saniye ile 30 dk. arası beklenerek banyo işlemi gerçekleştirilmiştir. Filmler üstünde oluşan PCR ve prob sıralarının kesişmesiyle oluşan siyah lekeler pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

### 2.8.1. RLB Yönteminde Kullanılan Problar

Çalışmada toplanan koyun, keçi kanları ile yumurta kümelerinden elde edilen DNA örnekleri, *Theileria* ve *Babesia* türlerinin tespiti amacıyla PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. Türlerin tespiti için bu türlere ait 18S rRNA geninin V4 değişken bölgesini çoğaltan RLB-F2 (5’GACACAGGGAGGTAGTGACAAG-3’) ve RLB-R2 (Biotin-5’-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT-3’) primerler seçilmiştir (Georges vd., 2001). RLBF2 ve RLBR2 primerleri ile RLB tekniğinde kullanılan problemlerin 5’ – uçlarında amino grubu N – (Trifluoracetamidoheksyl – eyanoethyl, N, N, -

diisopropyl phosoramidite (TFA)-C6 aminolinker) olacak biçimde “The Midland Certified Reagent (Co. Inc. A.B.D.) firmasına sentezlettirilmiştir. RLB için kullanılacak olan problemler DNaz ve RNaz içermeyen bi-distile steril suda 100 pmol / $\mu$ l yoğunlukta olacak şekilde sulandırılmıştır. Tez çalışması kapsamında membrana (*Theileria* + *Babesia*) Catchall, soya özgü *Theileria* spp. ve *Babesia* spp. problemleri ve daha önce koyun ve keçi ile ilgili araştırmalarda tanımlanan *Theileria* ve *Babesia* türlerine ait toplamda 16 farklı prob bağlanmıştır ( Gubbels vd., 1999; Nagore vd., 2004; Schnittger vd., 2004; Altay vd., 2007a; Ozubek ve Aktas , 2017a). RLB tekniğinde kullanılan problemler ile ilgili nükleotid dizilimleri ve yoğunlukları Çizelge 2.4’de verilmiştir.

**Çizelge 2.4:** RLB problemlerinin sekans dizilimleri ve yoğunlukları

| Özgün Türler                      | Prob Dizilimi (5’-3’)        | pmol/150 $\mu$ l |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------|
| <i>Theileria/Babesia</i> Catchall | TAATGGTTAATAGGA(AG)C(AG)GTTG | 200              |
| <i>Theileria</i> spp.             | TGATGGGAATTTAAACC(CT)CTTCCA  | 200              |
| <i>T. ovis</i>                    | TTTTGCTCCTTTACGAGTCTTTGC     | 400              |
| <i>T. lestoquardi</i>             | ATTGCTTGTGTCCCTCCG           | 400              |
| <i>T. uilenbergi</i>              | TGCATTTTCCGAGTGTTACT         | 400              |
| <i>T. luwenshuni</i>              | TCGGATGATACTTGTATTATC        | 400              |
| <i>Theileria</i> sp. OT1          | ATCTTCTTTTTGATGAGTTGGTGT     | 400              |
| <i>Theileria</i> sp. OT3          | ATTTTCTCTTTTTATATGAGTTTT     | 400              |
| <i>Theileria</i> sp. MK           | CATTGTTTCTTCTCATGTC          | 400              |
| <i>T. annulata</i>                | CCTCTGGGGTCTGTGCA            | 400              |
| <i>Babesia</i> Catchall 1         | ATTAGAGTGTTTCAAGCAGAC        | 200              |
| <i>Babesia</i> Catchall 2         | ACTAGAGTGTTTCAAACAGGC        | 200              |
| <i>B. ovis</i>                    | GCGCGCGGCCTTTGCGTTTACT       | 400              |
| <i>B. motasi</i>                  | ATTGGAGTATTGCGCTTGCTTTTT     | 400              |
| <i>B. crassa</i>                  | TTATGGCCCGTTGGCTTAT          | 400              |
| <i>Babesia</i> sp.                | TGCCGTGAATCGACATTCGTC        | 400              |

T: Thymine; A: Adenine; C: Cytosine; G: Guanine; R: A veya G; W: A veya T

## **2.9. Laboratuvar Aşamasında Kullanılan Sarf Malzemeler**

### **2.9.1. Mikroskopik İncelemede Kullanılan Solüsyonlar**

1. Giemsa stok solüsyonu: Giemsa stok solüsyonundan distile su ile %5'lik boyama solüsyonu hazırlanmıştır
2. İmmersiyon yağı
3. Metanol: Saf metanol frotilerin tespiti amacıyla kullanılmıştır

### **2.9.2. PCR Tekniğinde Kullanılan Solüsyonlar**

1.  $MgCl_2$
2. 10 X PCR buffer: 750 mM Tris-HCl (pH 8,8; 25 °C), 200 mM  $(NH_4)_2SO_4$ , %0,1 Tween 20 her bir PCR numunesi için 5 µl kullanılmıştır.
3. Taq DNA polymerase enzimi: Her bir PCR örneği için 1,25 U (0,25 µl) kullanılmıştır.
4. dNTP set (100 mM'lık miks; dATP + dTTP + dCTP + dGTP; Applied Biological Materials Inc. (abm): Steril distile su ile sulandırılarak 1,25 mM yoğunlukta kullanılmıştır.
5. Primerler: Primerler The Midland Certified Reagent firmasına sentezletirilmiştir.

### **2.9.3. RLB Tekniğinde Kullanılan Solüsyonlar**

1. 500 mM  $NaHCO_3$  (pH: 8.4): 21,0025 gr  $NaHCO_3$  500 ml distile su ile çözdürüldükten sonra, 10 M NaOH kullanılarak pH: 8.4'e ayarlanmıştır.
2. %16 EDAC (1-etil-3 dimetilaminopropil karbodimin): 1,6 gr EDAC, distile su ile 10 mililitreye tamamlanır. Solüsyon her kullanımdan önce taze olarak hazırlanmıştır.
3. %10'luk SDS: 100 gr SDS 1 lt'ye distile su ile tamamlanmıştır.

4. 20X SSPE: 175,3 gr NaCl, 27,6 gr  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$  (sodium phosphate monobasic), 7,4 gr EDTA 800 ml distile su içinde çözdürülür. Daha sonra 10 M NaOH ile pH 7,4'e ayarlanır ve otoklavda 20 dk. tutulmuştur.
5. 2X SSPE: 20X SSPE'den 10 kat sulandırılarak hazırlanmıştır.
6. 2X SSPE / %0,1 SDS: 100 ml 20X SSPE ile 10 ml %10 SDS 890 ml distile su içinde karıştırılmıştır.
7. 2X SSPE / %0,15 SDS: 100 ml 20X SSPE ile 15 ml %10 SDS 885 ml distile su içinde karıştırılarak hazırlanmıştır.
8. 2X SSPE / %0,5 SDS: 100 ml 20X SSPE ile 50 ml %10 SDS 850 ml distile su içinde karıştırılarak hazırlanmıştır.
9. %1 SDS: %10'luk SDS stokundan 10 kat sulandırılarak elde edilir. Her seferinde taze olarak hazırlanmıştır.
10. 0,1 M EDTA: 37,224 gr EDTA 1 L distile suda çözdürülmüştür.
11. 20 mM EDTA: 0,1 M EDTA stokundan 5 kat sulandırılarak hazırlanmıştır.
12. Streptavidin POD conjugate: 10 ml 2X SSPE / %0,5 SDS solüsyonuna 2,5 U konjugat ilave edildikten sonra 1/4000 oranında sulandırılarak 0,125 U/ $\mu\text{l}$  olacak şekilde hazırlanmıştır. Her RLB için 20  $\mu\text{l}$  (2,5 U) kullanılmıştır.

## **2.10. Agaroze Jelin Hazırlanışı**

Agaroz 1 gr. tartılarak 100 ml 1X TAE Buffer içine konulmuştur. Karışım mikrodalga fırın kullanarak kaynayınca kadar ısıtılmıştır. Soğumasını takiben 6 $\mu\text{l}$  ethidium bromide ilave edilerek hazırlanmış olan karışım jel sehmasına dökülmüştür.

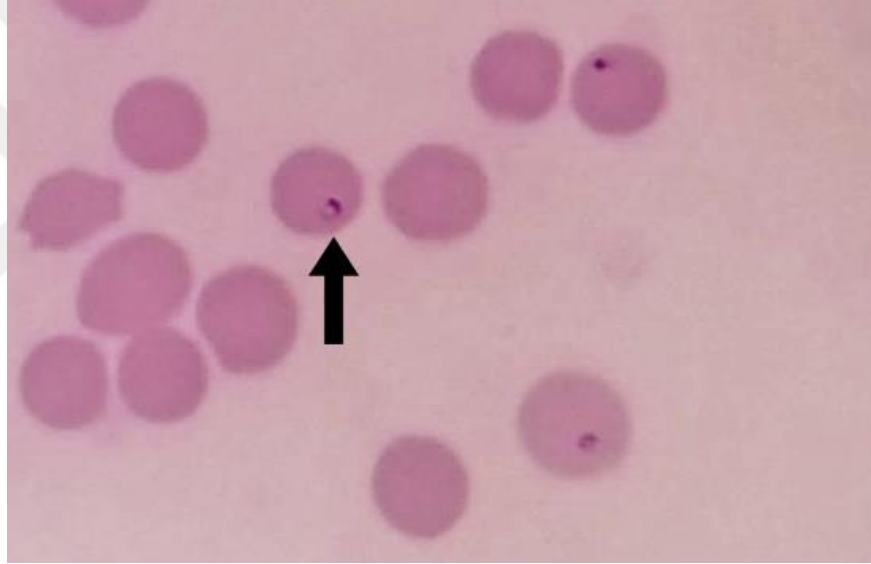
## **2.11. İstatistiksel Analiz**

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS 25.00 paket programı kullanılarak pearson ki-kare testiyle yapılmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Koyun ve Keçilerde *Theileria* ve *Babesia* Türlerinin Yaygınlığı

Bolvadin, İhsaniye, Şuhut, Sinanpaşa ve Hocalar ilçelerinden toplanan 200'ü koyun 200'ü keçi olmak üzere toplam 400 hayvan *Babesia* ve *Theileria* türleri yönünden mikroskopik muayene, PCR ve RLB teknikleri ile incelenmiştir. Kan frotilerinin mikroskopik muayenesinde koyun ve keçilerde *Babesia* türlerine, keçilerde ise *Theileria* türlerine rastlanamamıştır. Mikroskopik olarak muayene edilen koyunların 17'sinde (%8,5) *Theileria* spp. piroplasm formları tespit edilmiştir (Resim 3.1).



**Resim 3.1:** *Theileria* spp. piroplasm formları (orijinal)

Mikroskopik bakıda Hocalar ve Bolvadin ilçelerinde muayene edilen koyunlarda *Theileria* türleri görülmemiş, diğer araştırma merkezleri arasında en yüksek pozitiflik Şuhut (%27,5) ilçesinde saptanmıştır. *Theileria* spp. pozitif örneklerin ilçelere göre dağılımı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P < 0,001$ ) (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1:** Muayene edilen koyun ve keçilerde mikroskopik bakı, PCR ve RLB yöntemlerine göre belirlenen *Theileria* pozitifliklerinin araştırma merkezlerine göre dağılımı

| Hayvan Türü | Yöntem     | Araştırma Merkezleri   |                          |                           |                            |                           |                          |
|-------------|------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
|             |            | Hocalar                | Sinanpaşa                | İhsaniye                  | Şuhut                      | Bolvadin                  | Toplam                   |
| Koyun       | PCR        | 3 (%7,5) <sup>y</sup>  | 6 (%15) <sup>y</sup>     | 24 (%60) <sup>ax</sup>    | 19 (%47,5) <sup>bx</sup>   | 21 (%52,5) <sup>ax</sup>  | 73 (%36,5) <sup>b</sup>  |
|             | RLB        | 3 (%7,5) <sup>y</sup>  | 6 (%15) <sup>y</sup>     | 31 (%77,5) <sup>ax</sup>  | 28 (%70) <sup>ax</sup>     | 28 (%70) <sup>ax</sup>    | 96 (%48) <sup>a</sup>    |
|             | Mikroskopi | 0 (%0) <sup>z</sup>    | 1 (%2,5) <sup>yz</sup>   | 5 (%12,5) <sup>bx</sup>   | 11 (%27,5) <sup>ax</sup>   | 0 (%0) <sup>bz</sup>      | 17 (%8,5) <sup>c</sup>   |
|             | P          | -                      | -                        | ***                       | **                         | ***                       | ***                      |
|             | Toplam     | 6 (%5) <sup>y</sup>    | 13 (%10,83) <sup>y</sup> | 60 (%50) <sup>x</sup>     | 58 (%48,33) <sup>x</sup>   | 49 (%40,83) <sup>x</sup>  | 186 (%31) <sup>1</sup>   |
| Keçi        | PCR        | 1 (%2,5)               | 0 (%0)                   | 0 (%0)                    | 0 (%0)                     | 0 (%0)                    | 1 (%0,5)                 |
|             | RLB        | 1 (%2,5)               | 0 (%0)                   | 0 (%0)                    | 0 (%0)                     | 0 (%0)                    | 1 (%0,5)                 |
|             | Mikroskopi | 0 (%0)                 | 0 (%0)                   | 0 (%0)                    | 0 (%0)                     | 0 (%0)                    | 0 (%0)                   |
|             | P          | -                      | -                        | -                         | -                          | -                         | -                        |
|             | Toplam     | 2 (%1,67)              | 0 (%0)                   | 0 (%0)                    | 0 (%0)                     | 0 (%0)                    | 2 (%0,33) <sup>1</sup>   |
| Toplam      | PCR        | 4 (%5) <sup>y</sup>    | 6 (%7,5) <sup>y</sup>    | 24 (%30) <sup>ax</sup>    | 19 (%23,75) <sup>abx</sup> | 21 (%26,25) <sup>ax</sup> | 74 (%18,5) <sup>b</sup>  |
|             | RLB        | 4 (%5) <sup>y</sup>    | 6 (%7,5) <sup>y</sup>    | 31 (%38,75) <sup>ax</sup> | 28 (%35) <sup>ax</sup>     | 28 (%35) <sup>ax</sup>    | 97 (%24,25) <sup>a</sup> |
|             | Mikroskopi | 0 (%0) <sup>z</sup>    | 1 (%1,25) <sup>yz</sup>  | 5 (%6,25) <sup>bx</sup>   | 11 (%13,75) <sup>bx</sup>  | 0 (%0) <sup>bz</sup>      | 17 (%4,25) <sup>c</sup>  |
|             | P          | -                      | -                        | ***                       | **                         | ***                       | ***                      |
|             | Toplam     | 8 (%3,33) <sup>y</sup> | 13 (%5,42) <sup>y</sup>  | 60 (%25) <sup>x</sup>     | 58 (%24,17) <sup>x</sup>   | 49 (%20,42) <sup>x</sup>  | 188 (%15,67)             |

<sup>1</sup>: Koyun ve keçiler arasında *Theileria ovis* görülme oranı bakımından önemli farklılık bulunmuştur (P<0,001).

<sup>a,b,c</sup>: Farklı harfleri taşıyan aynı sütundaki gruplar arasında önemli düzeyde farklılık saptanmıştır.

<sup>x,y,z</sup>: Farklı harfleri taşıyan aynı satırdaki gruplar arasında önemli düzeyde farklılık bulunmuştur (P<0,001).

\*\*: P<0,01 \*\*\*: p<0,001

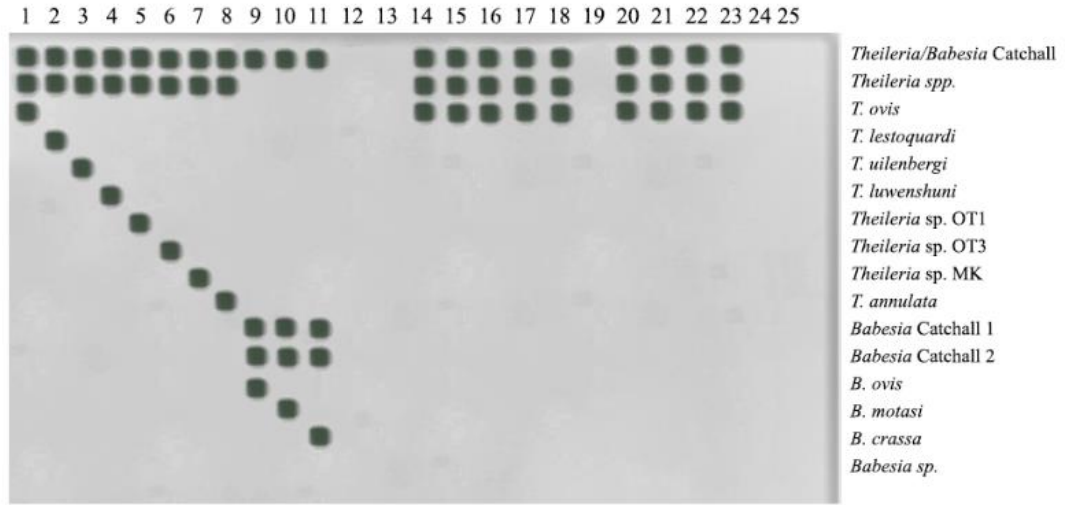
Mikroskopik bakıda pozitif bulunan numunelere ait DNA'lar kullanılarak PCR ve RLB teknikleri uygulanmıştır. Bu işlemlerin sonucunda parazitlerin *T. ovis* türü oldukları tespit edilmiştir. Koyun ve keçi kanlarından izole edilen DNA örneklerine RLB-F2/RLB-R2 primerleri ile PCR tekniği uygulandığında, 400 örneğin 74'ünde (%18,5) pozitiflik tespit edilmiştir. *Theileria ovis*, PCR tekniğine göre koyunlarda %36,5, keçilerde ise %0,5 oranında tespit edilmiştir. PCR pozitiflik düzeyi en yüksek İhsaniye (%30)'de, en düşük Hocalar (%5) ilçesinde saptanmıştır (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2:** Muayene edilen koyun ve keçilerde PCR sonuçlarının ilçelere ve hayvan türlerine göre dağılımı

| İlçeler   | Koyun         |                           | Keçi          |                           | Toplam        |                           |
|-----------|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|
|           | Hayvan sayısı | Pozitif hayvan sayısı (%) | Hayvan sayısı | Pozitif hayvan sayısı (%) | Hayvan sayısı | Pozitif hayvan sayısı (%) |
| Hocalar   | 40            | 3 (%7,5)                  | 40            | 1 (%2,5)                  | 80            | 4 (%5)                    |
| Sinanpaşa | 40            | 6 (%15)                   | 40            | 0                         | 80            | 6 (%7,5)                  |
| İhsaniye  | 40            | 24 (%60)                  | 40            | 0                         | 80            | 24(%30)                   |
| Şuhut     | 40            | 19 (%47,5)                | 40            | 0                         | 80            | 19(%23,75)                |
| Bolvadin  | 40            | 21 (%52,5)                | 40            | 0                         | 80            | 21(%26,25)                |
| Toplam    | 200           | 73 (%36,5)                | 200           | 1(%0,5)                   | 400           | 74(%18,5)                 |

İlçelerde PCR ile *Theileria ovis* pozitiflik yüzdeleri arasındaki farklılık, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P < 0,001$ ) (Çizelge 3.1).

Polimeraz zincir reaksiyonunda elde edilen ürünler, *Theileria* ve *Babesia* soy ve türe özgü probların bağlandığı membranda hibridizasyona tabi tutulduğunda, prob karşılıkları ile sinyal oluşturmuşlardır (Resim 3.2).



**Resim 3.2:** Saha örnekleri ve pozitif kontrollere ait PCR ürünlerinin RLB görüntüsü. Soldan sağa prob sıraları, yukarıdan aşağıya örnek sıraları. 1-11 pozitif kontrol (1, *T. ovis*; 2, *T. lestoquardi*; 3, *T. uilenbergi*; 4, *T. luwenshuni*; 5, *Theileria* sp. OT1; 6, *Theileria* sp. OT3; 7, *Theileria* sp. MK ;8, *T. annulata*; 9, *B. ovis*; 10, *B. motasi*; 11, *B. crassa*), 12-13 negatif kontrol (enfekte olmayan koyun DNA'sı), 14-25 saha örnekleri (*T. ovis*; 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, negatif saha örneği; 19, 24, 25)

Koyun ve keçilerden elde edilen 400 DNA numunesi, RLB tekniği ile *Babesia* ve *Theileria* parazitlerinin varlığı yönünden incelenmiş, *Babesia* türlerine rastlanamamıştır. Pozitif örneklerde ise tek türle (*T. ovis*) enfeksiyon görülmüş, miks enfeksiyona rastlanamamıştır. PCR ürünlerinin RLB hibridizasyonunda, 400 örneğin 97'si (%24,25) *T. ovis* probuna sinyal vermiştir. *Theileria ovis*, RLB tekniğine göre koyunlarda %48, keçilerde ise %0,5 oranında saptanmıştır. RLB pozitiflik oranı en yüksek İhsaniye (%38,75) ilçesinde, en düşük Hocalar (%5) ilçesinde tespit edilmiştir (Çizelge 3.3). İlçelere göre RLB pozitiflik oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P < 0,001$ ) (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.3:** Muayene edilen koyun ve keçilerde RLB sonuçlarının ilçelere ve hayvan türlerine göre dağılımı

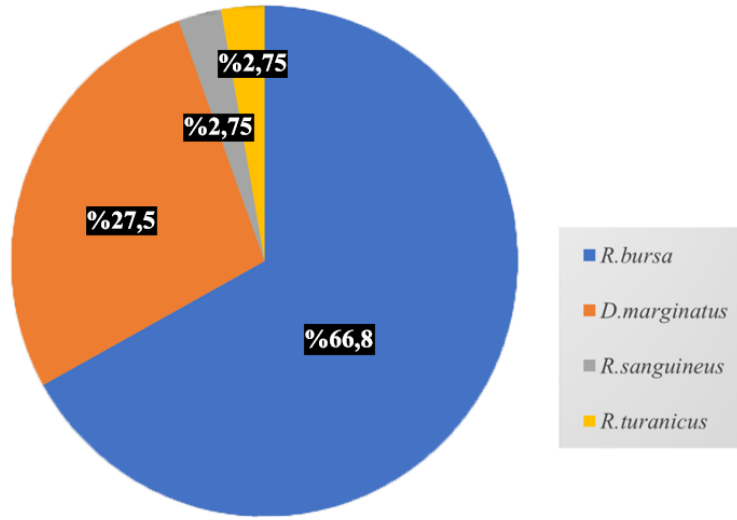
| İlçeler   | Koyun         |                           | Keçi          |                           | Toplam        |                           |
|-----------|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|
|           | Hayvan sayısı | Pozitif hayvan sayısı (%) | Hayvan sayısı | Pozitif hayvan sayısı (%) | Hayvan sayısı | Pozitif hayvan sayısı (%) |
| Hocalar   | 40            | 3(%7,5)                   | 40            | 1(%2,5)                   | 80            | 4(%5)                     |
| Sinanpaşa | 40            | 6(%15)                    | 40            | 0                         | 80            | 6(%7,5)                   |
| İhsaniye  | 40            | 31(%77,5)                 | 40            | 0                         | 80            | 31(%38,75)                |
| Şuhut     | 40            | 28(%70)                   | 40            | 0                         | 80            | 28(%35)                   |
| Bolvadin  | 40            | 28(%70)                   | 40            | 0                         | 80            | 28(%35)                   |
| Toplam    | 200           | 96(%48)                   | 200           | 1(%0,5)                   | 400           | 97(%24,25)                |

Araştırmada kullanılan mikroskopik muayene, PCR ve RLB yöntemlerinin duyarlılıkları karşılaştırılmış, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P < 0,001$ ). Mikroskopik bakıya göre PCR ve RLB tekniğinin, PCR'ye göre RLB yönteminin daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Koyun ve keçilerdeki *T. ovis* pozitiflikleri karşılaştırıldığında, enfeksiyonun görülme yüzdesinin koyunlarda keçilere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P < 0,001$ ) (Çizelge 3.1).

### 3.2. Enfeste Koyun ve Keçilerdeki Kene Türleri

Çalışma süresince koyun ve keçilerden 81 erkek, 64 dişi olmak üzere 145 olgun kene toplanmıştır. Toplanan kenelerin 97'si (%66,8) *Rhipicephalus bursa*, 40'ı (%27,58) *Dermacentor marginatus*, 4'ü (%2,75) *R. turanicus* ve 4'ü (%2,75) *R. sanguineus* olarak teşhis edilmiştir (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1:** Enfeste koyun ve keçilerden toplanan olgun kenelerin türlere göre dağılımı (%)

Kene enfestasyonu yönünden muayene edilen 400 hayvanın %10,75'inin çeşitli kene türleriyle enfeste olduğu saptanmıştır. Enfestasyon oranı koyunlarda %9, keçilerde ise %12,5 olarak bulunmuştur. Kene enfestasyon oranı en yüksek İhsaniye (%26,25) ilçesinde, en düşük (%1,25) Hocalar ilçesinde tespit edilmiştir (Çizelge 3.4).

**Çizelge 3.4:** Kenelerin konak ve araştırma merkezlerine göre dağılımı

| İlçeler   | Enfestasyon oranı (%) |               |                |
|-----------|-----------------------|---------------|----------------|
|           | Koyun                 | Keçi          | Toplam         |
| Şuhut     | 0,25 (1/40) *         | 10 (4/40)     | 6,25 (5/80)    |
| Hocalar   | 0,25 (1/40)           | 0 (0/40)      | 1,25 (1/80)    |
| Bolvadin  | 5 (2/40)              | 27,5 (11/40)  | 16,25 (13/80)  |
| İhsaniye  | 27,5 (11/40)          | 25 (10/40)    | 26,25 (21/80)  |
| Sinanpaşa | 7,5 (3/40)            | 0 (0/40)      | 3,75 (3/80)    |
| Toplam    | 9 (18/200)            | 12,5 (25/200) | 10,75 (43/400) |

\*Enfeste hayvan sayısı / Muayene edilen hayvan sayısı

En fazla kenenin (82 adet) toplandığı İhsaniye ilçesinde en yaygın türün *R. bursa* (59 adet) olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.5:** Kene türlerinin konak ve çalışma merkezlerine göre dağılımı

| İlçeler   | <i>R. bursa</i> |      | <i>D. marginatus</i> |      | <i>R. turanicus</i> |      | <i>R. sanguineus</i> |      | Toplam |
|-----------|-----------------|------|----------------------|------|---------------------|------|----------------------|------|--------|
|           | Koyun           | Keçi | Koyun                | Keçi | Koyun               | Keçi | Koyun                | Keçi |        |
| Şuhut     | 1               | 10   | 2                    | 0    | 0                   | 0    | 0                    | 0    | 13     |
| Hocalar   | 1               | 0    | 2                    | 0    | 0                   | 0    | 0                    | 0    | 3      |
| Bolvadin  | 4               | 18   | 0                    | 0    | 0                   | 3    | 0                    | 4    | 29     |
| İhsaniye  | 40              | 19   | 1                    | 21   | 0                   | 1    | 0                    | 0    | 82     |
| Sinanpaşa | 4               | 0    | 14                   | 0    | 0                   | 0    | 0                    | 0    | 18     |
| Toplam    | 50              | 47   | 19                   | 21   | 0                   | 4    | 0                    | 4    | 145    |

Çalışmada koyun ve keçiler üzerinden toplanan ve *R. bursa* olarak teşhis edilen 10 adet doymuş dişi keneler, yumurtlatılmak üzere etüve konulmuş, 10 adet yumurta kümesi elde edilmiştir. Yumurta kümelerinden ekstrakte edilen DNA'lar, *Babesia* türleri yönünden incelenmiş, negatif sonuç bulunmuştur.

#### 4. TARTIŞMA

Türkiye’de koyun ve keçi yetiştiriciliği yaygın olarak yapılmaktadır. Küçük ruminant yetiştiriciliğinde görülen kayıplar genellikle hastalıklardan kaynaklanmakta, bu hastalıklar içinde paraziter hastalıklar önemli bir yer tutmaktadır. Türkiye yer aldığı subtropik iklim kuşağı nedeniyle kene ve kene kaynaklı hastalıkların yaygın olarak görüldüğü bir ülkedir. Babesiosis ve theileriosis gibi kene kaynaklı hastalıklar, özellikle kültür ırkı hayvanlarda yapağı kalitesinde bozulmaya, et ile süt veriminde azalmaya ve ölüme neden olmaktadır. Sözü edilen verim kayıplarının yanı sıra veteriner hekim ve tedavi giderleri bu hastalıkların ekonomik boyutunu daha da artırmaktadır (Cicek vd., 2009; Hacılarlıoğlu ve Karagenç 2015).

Günümüze kadar küçük ruminantlarda *Theileria lestoquardi* (*T. hirci*), *T. uilenbergi* (*Theileria* sp. China 2), *T. luwenshuni* (*Theileria* sp. China 1), *T. ovis*, *T. separata*, *T. recondite*, *Theileria* sp. OT1, *Theileria* sp. OT3, *Theileria* sp. MK, *Babesia ovis*, *B. motasi*, *B. crassa*, *B. taylori*, *B. foliata*, *Babesia* sp. Xinjiang, *Babesia* sp. BQ1, *Babesia* sp. tespit edilmiştir. Bu türlerden *T. lestoquardi*, *T. luwenshuni*, *T. uilenbergi*, *B. ovis* ve *B. motasi* oldukça patojendir. *Theileria ovis*, *T. separata*, *T. recondite*, *B. crassa* ve *Babesia* sp. Xinjiang genotipleri ise apatojen ya da düşük patojeniteli kabul edilmektedir (Karatepe ve Karatepe, 2016; Aydın ve Dumanlı, 2019). Türkiye’de küçük ruminantlarda *Babesia ovis*, *B. motasi* ve *B. crassa* türleri (Friedhoff, 1997; Bock vd., 2004, Uilenberg 2006; Schnittger vd., 2012; Bilgiç vd., 2017; Ceylan, 2021) ile *Theileria lestoquardi* (syn: *T. hirci*), *T. recondita* (syn: *T. ovis*) (Uilenberg 1981; Friedhoff, 1997; Luo ve Yin, 1997; Schnittger vd., 2004; Aktaş vd., 2006; Yin vd., 2007; Ahmed vd., 2013), *T. separata*, *Theileria* sp. OT1, *Theileria* sp. MK, *Theileria* sp. OT3, *T. luwenshuni* ve *T. uilenbergi* (Altay vd., 2007; Ozubek ve Aktas 2017a; Bilgiç vd., 2017) türleri tespit edilmiştir.

Akut babesiosis ile theileriosisin teşhisi öncelikle klinik ve mikroskobik olarak yapılmaktadır. Mikroskobik muayene tür tespitinde ve düşük parazitemide yetersiz kalmaktadır. Bu yöntemde, türler arası morfolojik benzerlik yanlış teşhise

yol açtığı gibi subklinik enfeksiyonlarda etkenlerin tespitini güçleştirmektedir (Karatepe ve Karatepe, 2016; Ozubek ve Aktas, 2017a; Aydın ve Dumanlı, 2019). Subklinik enfeksiyonlar ile enfeksiyonu geçiren hayvanların belirlenmesinde ELISA, IFA, IHA, CF ve LAT gibi serolojik testler uzunca bir süredir kullanılmaktadır (Levine, 1985; Soulsby 1986; Karatepe ve Karatepe 2016; Chung vd., 2017). Sürü taramalarında sıklıkla kullanılan serolojik testlerin de türler arası çapraz reaksiyon verme ve tedavi edilen hayvanlarda antikorların varlığına bağlı yanlış seropozitiflik sonucu gibi sınırlayıcı etkileri bulunmaktadır. Bahsi geçen olumsuzluklar, duyarlılığı ve güvenilirliği daha yüksek olan, tür identifikasyonu da sağlayan PCR, RLB gibi moleküler yöntemlere ilgiyi artırmıştır (Figueroa vd., 1993; Aktas vd., 2005c; Criado-Fornelio vd., 2009; Ramos vd., 2011; Horta vd., 2014; Romero-Salas vd., 2016). Günümüzde moleküler teknikler, kene kaynaklı hastalıkların teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Aydın ve Dumanlı, 2019).

Bu çalışmada kan frotilerinin mikroskopik muayenesinde koyun ve keçilerde *Babesia* türlerine, keçilerde ise *Theileria* türlerine rastlanamamıştır. Mikroskopik olarak muayene edilen koyunların 17'sinde (%8,5) *Theileria* spp. piroplasm formları tespit edilmiştir. Göksu (1967), İç Anadolu ve Doğu Anadolu bölgesinde yaptığı bir çalışmada *B. ovis*'i hastalıktan şüpheli hayvanlarda %24,82 oranında, sağlıklı hayvanlarda ise %0,95 oranında tespit etmiştir. Hoffmann vd. (1971), bu türü sağlıklı koyun ve keçilerde %3,1 oranında saptamıştır. Taşcı (1989), Van ilindeki sağlıklı koyunlarda *B. ovis*'in mikroskopik prevalansını %0,85 oranında bulmuştur. Ozer vd. (1993), bu türü sağlıklı küçük ruminantlarda mikroskopik olarak %0,6 oranında belirlemiştir. Afyonkarahisar ilinde 400 küçük ruminant üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmada mikroskopik muayenede *Babesia* spp.'ye rastlanamamıştır. Bu durumun düşük parazitemiden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Karatepe ve Karatepe, 2016; Ozubek ve Aktas, 2017a; Aydın ve Dumanlı, 2019). Hoffmann vd. (1971), sağlıklı ruminantlarda *T. recondita* (syn: *T. ovis*)'yı mikroskopik yöntemle %3,1 oranında tespit etmiştir. Guralp vd. (1975), sağlıklı koyunlarda türün mikroskopik prevalansını %1,44 oranında saptamıştır. Daha sonraki yıllarda küçük ruminantlarda yapılan mikroskopik çalışmalarda *Theileria* spp.'nin prevalansı %7,4-18,4 arasında saptanmıştır (Ozer vd., 1993; Inci vd., 2003; Aktaş vd., 2005; Kocabeyoğlu, 2009).

Afyonkarahisar ilinde küçük ruminantlarda gerçekleştirilen bu çalışmada, mikroskopik muayene ile koyunlarda *Theileria* spp.'ye %8,5 oranında rastlanırken keçilerde tespit edilememiştir. Prevalans değerleri arasındaki farklılığın araştırmaların yapıldığı bölgeler arası iklimsel farklılıklardan, vektör kene popülasyonundan, konakların vektör kene ile enfestasyon oranından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Türkiye’de son yıllarda kene kaynaklı hastalıkların teşhisinde nükleik asit tabanlı moleküler teknikler, mikroskopik ve serolojik tekniklere alternatif olarak yaygın kullanım alanı bulmuştur. Küçük ruminantlarda ilk moleküler çalışma Elazığ ilinde Aktaş vd. (2005c), tarafından gerçekleştirilmiş, sağlıklı hayvanların %4,08’i mikroskopik muayeneye, %21,42’si PCR tekniği ile *B. ovis* yönünden pozitif bulunmuştur. Aktaş vd. (2007), bu türü, Doğu ve Güneydoğu Anadolu’da sağlıklı küçük ruminantlarda mikroskopik olarak %1,5, PCR tekniği ile %8,25 oranında tespit etmişlerdir. Saraylı vd. (2006), Kayseri ilindeki küçük ruminantlarda bu türü mikroskopik olarak %3, RLB tekniği ile %3,7 oranında tespit etmişlerdir. Altay vd. (2007), Doğu Anadolu’da sağlıklı küçük ruminantlarda *B. ovis*’in moleküler prevalansını RLB tekniği ile %5,43 oranında bulmuşlardır. Kose (2017), Burdur ilindeki sağlıklı küçük ruminantlarda, RLB ile prevalans değerini %0,31 olarak tespit etmiştir. Bilgiç vd. (2017), Ege, Akdeniz, İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu’da sağlıklı küçük ruminantlarda *B. ovis*’in moleküler prevalansını PCR ile %4,9, RLB ile %0,4 oranında tespit etmişlerdir. Bilgiç vd. (2017), bu türü Afyonkarahisar ilindeki 100 küçük ruminantta PCR yöntemiyle %27 oranında bildirmişlerdir. Ceylan vd. (2021), 6 farklı coğrafi bölgede sağlıklı koyunlarda PCR ile yaptıkları bir çalışmada, Afyon ilindeki 20 koyunda *B. ovis*’e rastlamadıklarını bildirmişlerdir. PCR ve RLB tekniği ile 200 koyun ve 200 keçi üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmada *B. ovis* türüne rastlanamamıştır.

Türkiye’de küçük ruminantlarda *T. ovis*’in varlığına yönelik ilk moleküler çalışma Altay vd. (2005), tarafından Doğu Anadolu’daki 124 sağlıklı koyunda yapılmış, bu türün prevalansı PCR tekniğiyle %54,03 olarak bulunmuştur. Aktaş vd. (2005b), Elazığ’da 164 sağlıklı küçük ruminantta yaptıkları bir çalışmada, aynı

teknikle bu türün prevalansını %43,29 oranında tespit etmişlerdir. Saraylı vd. (2006), Kayseri’de RLB yöntemiyle *T. ovis*’i 200 koyunun %48’inde, 100 keçinin %17’sinde saptamışlardır. Altay vd. (2007), Doğu ve Güneydoğu Anadolu’da PCR ile 677 koyunun %58,79’unda, 142 keçinin %11,27’de *T. ovis*’i saptamıştır. Zhou vd. (2017), İç Anadolu bölgesindeki sağlıklı 343 küçük ruminantta PCR ile bu türün moleküler prevalansını %5,8 olarak tespit etmiş, prevalans değeri test yapılan 249 koyunda %6,4, 94 keçide ise %4,3 olarak belirlenmiştir. Bilgiç vd. (2017), 5 farklı coğrafi bölgedeki sağlıklı 1979 küçük ruminantta PCR tekniğiyle yaptıkları çalışmada, en yaygın türün *T. ovis* (%61,4) olduğunu açıklamışlardır. Bilgiç vd. (2017), bu türü Afyonkarahisar’da test ettikleri 100 küçük ruminantın %97’sinde saptamışlardır. Ceylan vd. (2021), 6 farklı coğrafi bölgede 299 sağlıklı koyunda, *T. ovis*’in PCR ile moleküler prevalansını %41,47 oranında bulmuşlardır. Aynı çalışmada Afyonkarahisar ilindeki 20 koyunun 13 (%65)’ünde etkene rastlandığı bildirilmiştir. Daha çok sayıda (400) ve daha fazla odakta (5) gerçekleştirilen tez çalışmasında bu türe hayvanların %18,5’inde rastlanmış, *T. ovis*, koyunlarda %36,5, keçilerde ise %0,5 oranında tespit edilmiştir. Prevalans değerleri arasındaki farklılığın çalışmaya dahil edilen hayvan sayılarının ve çalışmanın yapıldığı odak sayısının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Doğu Karadeniz’de 201 sağlıklı küçük ruminantta RLB testiyle kene kaynaklı parazitler araştırılmış, test yapılan hayvanların %19,90’nında *Theileria* tür ve genotiplerine rastlanmıştır. En yaygın tür *T. ovis* (%18,90) olarak bulunurken *Theileria* sp. MK %0,99, *Theileria* sp. OT3 %0,49 oranlarında saptanmıştır. Diğer *Theileria* türleri ve genotipleri (*T. lestoquardi*, *T. luwenshuni*, *T. uilenbergi*, *Theileria* sp. OT1) ile *Babesia* türlerine (*B. ovis*, *B. motasi* ve *B. crassa*) rastlanamamıştır. *Theileria* enfeksiyonu koyunlarda %28,90 ve keçilerde %4,10 olarak saptanmış, farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Altay vd. 2012). Afyonkarahisar ilinde 200 koyun ve 200 keçi olmak üzere 400 sağlıklı küçük ruminantta yapılan bu çalışmada RLB tekniği ile *T. ovis* %24,25 oranında saptanmıştır. Koyun ve keçilerdeki *T. ovis* pozitiflikleri karşılaştırıldığında, enfeksiyonun görülme yüzdesi koyunlarda (%48) keçilere (%0,5) göre daha yüksek saptanmış, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı ( $P<0,001$ ) bulunmuştur. Diğer

*Theileria* tür ve genotipleri ile *Babesia* türlerine rastlanamamıştır. Prevalans değerinin keçilerde düşük olmasının, yetiştiricilik tarzı nedeniyle vektör kenelere maruz kalma oranının düşük olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Tezden elde edilen sonuçlar Altay vd. (2012), bulgularıyla benzerlik göstermektedir. İç Anadolu bölgesinde 421 koyun ve 152 keçide RLB ile *Babesia* ve *Theileria* türleri araştırılmış *B. ovis*; koyunların %2,9'unda, keçilerin %2'sinde, *T. ovis*; koyunların %42'sinde, keçilerin %11,2'sinde bulunmuştur (Inci vd., 2010). İç Anadolu bölgesinde yapılan bir diğer çalışmada, sağlıklı 309 küçük ruminant ile bunlardan toplanan 408 keneden oluşturulan 27 havuzda *Theileria* ve *Babesia* türleri RLB tekniği ile araştırılmış; *T. ovis*, *Theileria* sp. MK., *Theileria* sp. OT3 ve *B. ovis* tür ve genotiplerine rastlanmıştır. Test edilen 309 küçük ruminantın %39,16'da *T. ovis* türüne rastlanmıştır, etken 206 koyunun %56,80'inde, 103 keçinin ise %3,88'inde tespit edilmiştir. *Theileria* sp. OT3 koyunların %4,85'inde, *Theileria* sp. MK ise koyunların %3,88'inde saptanmıştır. Toplanan kenelerin 10'unda *T. ovis*'e, 2'sinde *B. ovis*'e rastlanmıştır (Altay vd., 2017). Özübek ve Aktas (2017a), Adana, Gaziantep ve Adıyaman ilçelerindeki 333 sağlıklı küçük ruminantta RLB ile yaptıkları bir çalışmada, *T. ovis*'e %35,4, *T. annulata*'ya % 3,9, *Theileria* sp. MK'ye %0,3, *B. ovis*'e %5,4 oranlarında rastladıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca hayvanlar üzerinden topladıkları kenelerden 2 adet *R. bursa*'ya ait yumurta kümesinde *B. ovis*'i saptamışlardır.

Afyonkarahisar'da gerçekleştirilen bu çalışmada, koyun ve keçilerden alınan kan numuneleri ile hayvanların üzerinden toplanan ve *R. bursa* olarak teşhis edilen 10 adet doymuş dişi keneden elde edilen yumurta kümelerinde de *Babesia* türlerine rastlanamamıştır. Kahramanmaraş ilinde 300 keçide yapılan bir çalışmada RLB tekniği ile keçilerin 1 (%0,33)'inde *T. ovis* tespit edilmiştir (Kocabeyoğlu, 2009). Afyonkarahisar ilinde aynı teknikle bu tür 200 keçinin 1 (%0,5)'inde saptanmış, prevalans değerleri arasında benzerlik görülmüştür. Bilgiç vd. (2017), 5 farklı coğrafi bölgedeki sağlıklı 1979 küçük ruminantta RLB ile hayvanların %39,1'inde tek türle, %35,42'sinde ise birden fazla türle miks enfeksiyona rastlamışlardır. Test edilen numunelerde en yaygın *Theileria* türünün *T. ovis* (%60) olduğu tespit edilmiş, bunu

*Theileria* sp. OT1 (%2,6), *T. uilenbergi* (%0,5), *Theileria* sp. MK (%0,4) ve *Theileria* sp. OT3 (%0,2) izlemiştir. Teşhis edilemeyen *Babesia* spp. %5,4, *B. crassa* %4 ve *B. ovis* %0,4, *B. motasi* %0,1 oranında saptanmıştır. *Theileria luwenshuni* ve *T. separata* yalnızca 2 örnekte bulunmuştur. *Theileria ovis*'e Afyonkarahisar ilindeki 100 hayvanın 52'sinde tek türle enfeksiyon şeklinde rastlanmıştır. Aynı yöntem kullanılarak daha fazla sayıda (400) küçük ruminatta ve odakta gerçekleştirilen bu çalışmada hayvanların 97'sinin (%24,25) tek türle (*T. ovis*) enfekte olduğu tespit edilmiştir.

Çalışma süresince koyun ve keçilerden 145 olgun kene toplanmıştır. Toplanan kenelerin 97'si (%66,8) *Rhipicephalus bursa*, 40'ı (%27,58) *Dermacentor marginatus*, 4'ü (%2,75) *R. turanicus* ve 4'ü (%2,75) *R. sanguineus* olarak teşhis edilmiştir. *Theileria ovis* PCR ile 400 küçük ruminantın %18,5'inde, RLB ile %24,25'inde tek tür olarak tespit edilmiştir. *Theileria ovis*, *Rhipicephalus* türü kenelerle transstadial olarak nakledilmektedir (Uilenberg, 1995). Türkiye'de *R. bursa*'nın sahada önemli bir vektör olduğu vurgulanmıştır (Aktas vd., 2006). Afyonkarahisar ilinde yapılan bu çalışmada PCR ve RLB yöntemleriyle ilçelerde saptanan *Theileria ovis* pozitiflik yüzdeleri arasındaki farklılık, istatistiksel olarak önemli ( $P<0,001$ ) bulunmuştur. *Theileria ovis* yönünden en yüksek pozitiflik PCR (%30) ve RLB (%38,75) yöntemleri ile İhsaniye ilçesinde saptanmıştır. En fazla kenenin (82 adet) toplandığı İhsaniye ilçesinde en yaygın kene türünün *R. bursa* olduğu dikkati çekmiştir. Az miktarda kenenin (3 adet) toplandığı Hocalar ilçesinde *Theileria ovis*'in moleküler prevalansının PCR (%5) ve RLB (%5) yöntemleri ile düşük olduğu tespit edilmiştir. Hocalar ilçesinde gündüz ile gece arasındaki sıcaklık farklılığının, diğer ilçelere kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (İnt, Kyn. 2; MGM, 2020). İlçeler arası prevalans değerlerindeki farklılıkta iklim, yetiştirme tekniği ve vektör kene popülasyonundaki farklılık gibi faktörlerin etkili olabileceği düşünülmüştür.

Kene kaynaklı hastalıkların teşhisinde taşıyıcı hayvanlarda mikroskopik yöntemin yetersiz kalması, serolojik yöntemlerin ise yanlış pozitif ve negatif sonuçlar vermesi gibi sınırlayıcı faktörler moleküler yöntemlere ilgiyi artırmıştır.

Taşıyıcı hayvanlar, keneler için rezervuar olmaları, hayvan hareketiyle enfeksiyonu yeni bölgelere taşımaları gibi etkileriyle babesiosis ve theileriosis gibi kene kaynaklı hastalıkların epidemiyolojisinde önemli bir yere sahiptir. Son yıllarda epidemiyolojik çalışmalarda, PCR, multiplex PCR, nested PCR, touchdown PCR ve RLB teknikleri *Babesia* ve *Theileria* türlerini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Aydın, 2016; Bilgiç vd., 2017). PCR tabanlı moleküler teknikler düşük parazitemide ve çoklu enfeksiyonlarda etkenlerin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Moleküler yöntemlerden RLB yöntemi ile aynı örnekte birden fazla parazit aynı zaman diliminde belirlenebilmektedir. Bilgiç vd. (2017), küçük ruminantlarda kan parazitlerinin belirlenmesinde, single-PCR yönteminin RLB yöntemine nazaran daha duyarlı olduğunu açıklamışlardır. Afyonkarahisar ilinde yapılan tez çalışmasında, araştırmada kullanılan mikroskopik muayene, PCR ve RLB yöntemlerinin duyarlılıkları karşılaştırılmış, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $P<0,001$ ) bulunmuştur. Mikroskopik bakıya göre PCR ve RLB tekniğinin, PCR'ye göre RLB yönteminin daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, koyun ve keçi yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahip olan Afyonkarahisar ili koyun ve keçilerinde parazitlenen *Babesia* ve *Theileria* türlerinin varlığı ve yaygınlığı mikroskopik muayene, PCR ve RLB yöntemleriyle araştırılmıştır.

Çalışmada, 200'ü koyun 200'ü keçi olmak üzere toplam 400 küçük ruminantın kan frotilerinin mikroskopik muayenesinde koyun ve keçilerde *Babesia* türlerine, keçilerde ise *Theileria* türlerine rastlanamamıştır. Mikroskopik olarak muayene edilen koyunların 17'sinde (%8,5) *Theileria* spp. piroplasm formları tespit edilmiştir.

Araştırmada, 400 adet koyun ve keçi kan örneğinin 74 (%18,5)'ü PCR yöntemi ile *T. ovis* yönünden pozitif bulunmuştur. *Theileria ovis* ile tekli enfeksiyon koyunlarda %36,5, keçilerde ise %0,5 oranında tespit edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen koyun ve keçilerin kan örnekleri RLB tekniği ile *Babesia* ve *Theileria* parazitlerinin varlığı yönünden incelenmiş, *Babesia* türlerine rastlanamamıştır. Test uygulanan 400 örneğin 97 (%24,25)'sinde *T. ovis* tespit edilmiştir. *Theileria ovis*, RLB yöntemi ile koyunlarda %48, keçilerde ise %0,5 oranında saptanmıştır.

Koyun ve keçilerdeki *T. ovis* pozitiflikleri karşılaştırıldığında, enfeksiyonun görülme yüzdesinin koyunlarda keçilere göre daha yüksek olduğu saptanmış, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P<0,001$ ).

Araştırma merkezleri arasında en yüksek moleküler pozitiflik İhsaniye ilçesinde PCR yöntemiyle %30, RLB yöntemiyle %38,75 olarak tespit edilmiş,

ilçelere göre moleküler pozitiflik oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P < 0,001$ ).

Araştırmada kullanılan mikroskopik muayene, PCR ve RLB yöntemlerinin duyarlılıkları karşılaştırılmış, mikroskopik bakıya göre PCR ve RLB tekniğinin, PCR'ye göre RLB yönteminin daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir ( $P < 0,001$ ).

Çalışma süresince koyun ve keçiler üzerinden 145 olgun kene toplanmıştır. Toplanan kenelerin 97'si (%66,8) *Rhipicephalus bursa*, 40'ı (%27,58) *Dermacentor marginatus*, 4'ü (%2,75) *R. turanicus* ve 4'ü (%2,75) *R. sanguineus* olarak teşhis edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, Afyonkarahisar ilindeki küçük ruminantlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin varlığı ve yaygınlığına ilişkin elde edilen veriler bölge parazitolojik faunasına katkı sağlayacaktır. Afyonkarahisar ilindeki küçük ruminantlarda, babesiosis ve theileriosisin mevcut durumu hakkında bölge veteriner hekimlerinin bilgilendirilmesi açısından da önemli olacaktır. Araştırmanın, gelecekte konuyla ilgili olarak bölgede yapılacak diğer çalışmalar için de kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Ahmed, B. M., Taha, K. M., Enan, K. A., Elfahal, A. M., El Hussein, A. R. M. (2013). Attenuation of *Theileria lestoquardi* infected cells and immunization of sheep against malignant ovine theileriosis, *Vaccine*, 31(42): 4775-4781.
- Aktas, M., Düzgün, A., Cahit, B. (2001). Malatya yöresinde koyunlarda *B. ovis*' in seroprevalansı. *Türk J Vet Anim Sci*, 2001, 25: 241-243.
- Aktas, M., Altay, K., Dumanli, N. (2005a) Survey of *Theileria* parasites of sheep in eastern Turkey using polymerase chainreaction. *Small Rumin Res*, 60:289-293.
- Aktas, M., Dumanlı, N., Altay, K. (2005b). Elazığ yöresinde koyun ve keçilerde *Theileria ovis*'in Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg*, 29(1): 17-21.
- Aktas, M., Altay, K., Dumanlı, N. (2005c). Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of *Babesia ovis* infection in sheep and goats, *Vet Parasitol*, 133(4): 277-281.
- Aktas, M., Altay, K., Dumanli, N. (2006). PCR-based detection of *Theileria ovis* in *Rhipicephalus bursa* adult ticks. *Vet Parasitol*, 140(3-4): 259-263.
- Aktas, M., Altay, K., Dumanli, N. (2007). Determination of prevalence and risk factors for infection with *Babesia ovis* in small ruminants from Turkey by polymerase chain reaction. *Parasitol Res*, 100(4): 797-802.
- Aktas, M. (2014). Survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens *Vet Parasitol*, 200 (3-4); 276-283.
- Alani, A.J., Herbert, I.V. (1988). Morphology and transmission of *Theileria recondita* (*Theileriidae*: Sporozoa) isolated from *Haemaphysalis punctata* from North Wales. *Vet Parasitol*, 28(4): 283-291.
- Alcı, S. (2007). Bolvadin İlçesinde Araziden Yararlanma, Ankara Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 125s, Ankara.
- Altay, K., Dumanli, N., Holman. P.J., Aktas. M. (2005). Detection of *Theileria ovis* in naturally infected sheep by nested PCR. *Vet Parasitol*, 127(2):99-104.
- Altay, K., Dumanli, N., Aktas, M. (2007a). Molecular identification, genetic diversity and distribution of *Theileria* and *Babesia* species infecting small ruminants. *Vet Parasitol*, 147(1-2): 161-165.
- Altay, K., Aktas, M., Dumanli, N. (2007b). *Theileria* infections in small ruminants in the east and southeast Anatolia. *Türkiye Parazitol Derg*, 31(4):268-271.
- Altay, K., Dumanli, N., Aktas, M. (2012). A study on ovine tickborne hemoprotozoan parasites (*Theileria* and *Babesia*) in the East Black Sea Region of Turkey. *Parasitol Res* 111(1):149-153.
- Altay, K., Ataş, A.D., Özkan, E. (2017). Sivas yöresinde koyun keçi ve kenelerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin moleküler yöntemlerle araştırılması. *Manas J Agr Vet Life Sci.*, 7(1):30-39.

- Asada, M., Goto, Y., Yahata, K., Yokoyama, N., Kawai, S., Inoue, N., Kawazu, S. I. (2012). Gliding motility of *Babesia bovis* merozoites visualized by time-lapse video microscopy. *PLoS One*, 7(4): 622-636.
- Aydın, L. (1994). Güney Marmara Bölgesi Ruminantlarında Görülen Kene Türleri ve Yayılışları, Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Bursa.
- Aydın, M.F., Aktas, M., Dumanlı, N. (2013). Molecular identification of *Theileria* and *Babesia* in sheep and goats in the Black Sea Region of Turkey. *Parasitol Res*, 112(8): 2817-2824.
- Aydın, M.F. (2016). Description of Reverse Line Blotting (RLB) technique and RLB based studies aimed to determine *Theileria* and *Babesia* species in sheep and goats in Turkey. *Balıkesir Sağlık Bil. Derg*, 1: 46-49.
- Aydın, M.F., Dumanlı, N. (2019). Tick-borne pathogens in small ruminants in Turkey. *Türk Vet Review*, 1:74-83.
- Aydın, N. (2019). Kars Yöresinde Koyunlarda *Babesia* ve *Theileria* Türlerinin Moleküler Epidemiyolojisi, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 156s, Kars.
- Babes, V. (1888). Sur l'hémoglobininurie bacterienne du boeuf. *CR Acad. Sci*, 107: 692-694.
- Bakheit, M. A., Seitzer, U., Ahmed, J. S. (2006). A new recombinant protein-based ELISA for the diagnosis of malignant theileriosis of sheep and goats. *Parasitol Res*, 98(2): 145-149.
- Bami, M. H., Haddadzadeh, H. R., Kazemi, B., Khazraiania, P., Bandehpour, M., Aktas, M. (2009). Molecular identification of ovine *Theileria* species by a new PCR-RFLP method. *Vet Parasitol*, 161(3-4): 171-177.
- Benedicto, B., Ceylan, O., Moumouni, P. F. A., Lee, S. H., Tumwebaze, M. A., Li, J., Xuan, X. (2020). Molecular detection and assessment of risk factors for tick-borne diseases in sheep and goats from Turkey. *Acta Parasitol*, 65(3): 723-732.
- Besteiro, S., Dubremetz, J. F., Lebrun, M. (2011). The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell Microbiol*, 13(6): 797-805.
- Bicek, K., Deger, S. (2001). Van ve yöresi koyunlarında Babesiosis'in ELISA ile teşhisi. *YY Üniv Sağ Bil Derg*, 7:27-31.
- Bilgiç, H.B., Karagenç, T., Shiels, B., Tait, A., Eren, H., Weir, W. (2010). Evaluation of cytochrome b as a sensitive target for PCR based detection of *T. annulata* carrier animals. *Vet Parasitol*, 174(3-4): 341-347.
- Bilgiç, H.B., Bakırcı, S., Kose, O., Unlu, A. H., Hacılarlıoğlu, S., Eren, H., Weir, W., Karagenc, T. (2017). Prevalence of tick-borne haemoparasites in small ruminants in Turkey and diagnostic sensitivity of single-PCR and RLB. *Parasit Vectors*, 10(1):1-13.
- Bişkin, Z., Yıldırım, A., İnci, A., Düzlü, Ö. (2011). Parazitolojide Teşhis Amaçlı Kullanılan Moleküler Biyolojik Teknikler. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 8 (1): 43-51.
- Blackman, M.J., Bannister, L. H. (2001). Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol*, 117(1): 11-25.
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129(S1), S247-S269.
- Brands, S.J. (ed.), (1989-2005). *Systema Naturae 2000. The Taxonomicon*. Universal Taxonomic Services, Zwaag, The Netherlands. Erişim

[<http://taxonomicon.taxonomy.nl/>]. Erişim Tarihi:17.02.2020.

- Cakmak, A., Dincer, S., Karaer, Z. (1991). Samsun yöresinde koyunlarda Babesia ovis'in serodiagnozu üzerine araştırmalar. *Ankara niv Vet Fak Derg* 38:242-251.
- Ceylan, O., Byamukama, B., Ceylan, C., Galon, E. M., Liu, M., Masatani, T., Sevinc, F. (2021). Tick-Borne Hemoparasites of Sheep: A Molecular Research in Turkey. *Pathogens*, 10(2): 162.
- Chapman, W.E., Ward, P.A. (1977). *Babesia rodhaini*: requirement of complement for penetration of human erythrocytes. *Science*, 196 (4285):67-70.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., Malandrin, L. (2009). Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary research*, 40(2): 1-18.
- Chung, C.J., Suarez, C.E., Bandaranayaka-Mudiyanselage, C.L., Bandaranayaka-Mudiyanselage, C.B., Rzepka, J., Heiniger, T.J., Waldron, S.J. (2017). A novel modified-indirect ELISA based on spherical body protein 4 for detecting antibody during acute and long-term infections with diverse Babesia bovis strains. *Parasit Vectors*, 10(1): 77.
- Cicek, H., Duzgun, A., Emre, Z., Karaer, Z. (2004). Seroprevalance of Babesia ovis in sheep around Afyon. *Turk J Vet Anim Sci*, 28:683-686.
- Cicek, H., Cicek, H., Eser, M., TandoĖan, M. (2009). Current status of ruminant theileriosis and its economical impact in Turkey. *Türkiye Parasitol Derg*, 33: 273-279.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Asenzo, G., Benitez, D., Florin-Christensen, M., Gonzalez-Oliva, A., Torina, A. (2009). Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Vet Parasitol*, 162(3-4): 200-206.
- De Waal, D. T., Combrink, M. P. (2006). Live vaccines against bovine babesiosis. *Vet Parasitol*, 138(1-2): 88-96.
- Deger, S. (1990). Van ilinde koyunlarda babesiosisın seroepidemiyojisi üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Dominguez, M., Echaide, I., de Echaide, S. T., Mosqueda, J., Cetr, B., Suarez, C. E., Florin-Christensen, M. (2010). In silico predicted conserved B-cell epitopes in the merozoite surface antigen-2 family of B. bovis are neutralization sensitive. *Vet Parasitol*, 167(2-4): 216-226.
- Dumanlı, N., Koroglu, E., Duzgun, A., Angin, M., Kucukerden, N. (1997). Elzığ yöresinde koyunlarda Babesia ovis'in seroprevalansı. *Turk J Vet Anim Sci*, 21:183-186.
- Duzgun, A., Wright, I. G., Waltisbuhl, D. J., Gale, K. R., Goodger, B. V., Dargie, J. D., Cerci, H. (1991). An ELISA for the diagnosis of Babesia ovis infection utilizing a synthetic, Babesia bovis-derived antigen. *Vet Parasitol*, 39(3-4), 225-231.
- Duzgun, A. (1997). anakkale yöresinde koyunlarda Babesia ovis'in seroepidemiyojisi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Ekici, O. D., Sevinc, F., Isik, N. (2012). Instability of ovine babesiosis in an endemic area in Turkey. *Vet Parasitol*, 188(3-4): 372-375.
- El Imam, A. H., Taha, K. M. (2015). Malignant Ovine Theileriosis (Theileria lestoquardi): A Review. *Jordan J Bio Sci*, 8(3): 165-74.
- Emre, Z., Duzgun, A., İriadam, M., Sert, H. (2001). Seroprevalence of Babesia ovis in Awassi sheep in Urfa, *Turk J Vet Anim Sci*, 25(5): 759-762.

- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R. (2004). Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. a guide to identification of species. First Edition. Published by University of Zaragoza, Spain, 131.
- Figuerola, J.V., Chievas, L.P., Johnson, G.S., Buening, G. M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet Parasitol*, 50(1-2): 69-81.
- Florin-Christensen, M., Suarez, C. E., Rodriguez, A. E., Flores, D. A., Schnittger, L. (2014). Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. *Parasitology*, 141(12): 1563-1592.
- Friedhoff, K.T. (1997). Tick-borne diseases of sheep and goats caused by *Babesia*, *Theileria* or *Anaplasma* spp. *Parassitologia*, 39(2): 99-109.
- Georges, K., Loria, G. R., Riili, S., Greco, A., Caracappa, S., Jongejan, F., Sparagano, O. (2001). Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet Parasitol*, 99(4): 273-286.
- Gohil, S., Herrmann, S., Günther, S., Cooke, B. M. (2013). Bovine babesiosis in the 21st century: advances in biology and functional genomics. *International journal for parasitology*, 43(2): 125-132.
- Goksu, K. (1967). Yerli koyunlarımızda Babesidae ve Theileridae'lerin epizootolojik durumlarıyla biyolojilerine dair araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, No:205, Ankara, Turkey.
- Guan, G., Chauvin, A., Luo, J., Inoue, N., Moreau, E., Liu, Z., Yin, H. (2008). The development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *Babesia* spp. infective to sheep and goats in China. *Exp Parasitol*, 120(1), 39-44.
- Guan, G., Ma, M., Moreau, E., Liu, J., Lu, B., Bai, Q., Yin, H. (2009). A new ovine *Babesia* species transmitted by *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Exp Parasitol*, 122(4), 261-267.
- Guan, G., Moreau, E., Liu, J., Hao, X., Ma, M., Luo, J., Chauvin, A., Yin H. (2010). *Babesia* sp. BQ1(Lintan): Molecular evidence of experimental transmission to sheep by *Haemaphysalis qinghaiensis* and *Haemaphysalis longicornis*. *Parasitol Int*, 59(2), 265-267.
- Gubbels, J.M., De Vos, A.P., Van der Weide, M., Viseras, J., Schouls, L.M., De Vries, E., Jongejan, F. (1999). Simultaneous detection of bovine theileria and babesia species by reverse line blot hybridization. *Journal of clinical microbiology*, 37(6); 1782-1789.
- Gubbels, M.J., Duraisingh, M.T. (2012). Evolution of apicomplexan secretory organelles. *International journal for parasitology*, 42(12): 1071-1081.
- Guralp, N., Sayin, F., Tigin, Y., Tinar, R. (1975). Texel, Merinos ve Kivircik koyunlar ile melezlerinde gorulen parazit turleri, bunlarin enfeksiyon orani ve savas, careleri. *J Fac Vet Med*, 22:1-7.
- Hacılarlıoğlu, S., Karagenç T. (2015). Koyun Babesiosisi. *Animal Health Prod and Hyg*, 4 (1): 373-379.
- Hasherni-Fesharki, R., Uilenberg, G. (1981). *Babesia crassa* n. sp. (Sporozoa, Babesiidae) of domestic sheep in Iran. *Vet Q*, 3(1): 1-8.
- Hermann, P., MDobbelaere, D.A. (2006). Theileria-induced constitutive IKK activation is

- independent of functional Hsp90. *FEBS letters*, 580(21): 5023-5028.
- Hoffmann, G., Horchner, F., Schein, E., Gerber, HC. (1971). Seasonal appearance of ticks and piroplasms in domestic animals in the Asiatic provinces of Turkey. [Article in German]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 84:152-156.
- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., Krause, P.J., Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical microbiology reviews*, 13(3): 451-469.
- Horta, S., Barreto, M. C., Pepe, A., Campos, J., Oliva, A. (2014). Highly sensitive method for diagnosis of subclinical *B. ovis* infection. *Ticks Tick Borne Dis*, 5(6): 902-906.
- Inci, A., Yukari, B.A., Sayin, F. (1998). Çankırı yöresinde bazı koyun ve keçi sürülerinde babesiosis ve theileriosis etkenlerinin mikroskopik kan muayenesiyle araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 45:105-113.
- Inci, A., Karaer, Z., İça, A. (2002). Kayseri yöresinde koyun ve keçilerde babesiosis. *F Ü Sağ Bil Derg*, 16(1): 79-83.
- Inci, A., Nalbantoğlu, A.S., Çam, Y., Atasever, A., Karaer, Z., Çakmak, A., Deniz, A. (2003). Kayseri yöresinde koyun ve keçilerde Theileriosis ve kene efestasyonları. *Turk J Vet Anim Sci*, 27(1): 57-60.
- Inci, A., Bişkin, Z. (2007). Toll-like reseptörler ve protozoon enfeksiyonlarındaki rolleri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 4(2):121-129.
- Inci, A., İca, A., Yildirim, A., Düzlü, Ö. (2010). Identification of *Babesia* and *Theileria* species in small ruminants in Central Anatolia (Turkey) via reverse line blotting. *Turk J Vet Anim Sci*, 34(2): 205-210.
- Inci, A., Yildirim, A., Duzlu, O., Doganay, M., Aksoy, S. (2016). Tick-Borne Diseases in Turkey: A Review Based on One Health Perspective. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(12): 1-12.
- İça, A., Yıldırım, A., İnci, A. (2005). Kayseri yöresinde koyunlarda kan protozoonlarının reverse line blotting yöntemi ile araştırılması. 14th. Ulusal Parazitoloji Kongresi, İzmir, 161.
- İça, A., Özkan, F. (2015). Kütahya Yöresinde Yayılış Gösteren Kene Türlerinin Araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg*, 39: 117-123.
- İnt. Kay. 1, <http://www.theileria.org/ahdw/background.htm>, 03.01.2022
- İnt. Kay. 2, <https://www.afyon.bel.tr/icerikdetay/17/24/hocalar.aspx>, 03.01.2022
- Jongejan, F., Uilenberg, G. (1994). Ticks and control methods. *Revue scientifique et technique. International Office of Epizootics*, 13(4): 1201-1226.
- Jongejan, F., Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, 129(S1): S3-S14.
- Karaer, Z., Nalbantoğlu, S. (2005). Protozoon Hastalıklarında Tedavi. Ed: Burgu A, Karaer Z. Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıklarında Tedavi. İzmir, 14-18.
- Karagenç, T., Eren, H. (2007). *Theileria annulata* enfeksiyonunda immunité". Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji" Ed: Özcel M.A, İnci A, Turgay N, Köroğlu E. *Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları*, (21): 516-523.
- Karatepe, M., Karatepe, B., Çakmak, A., Nalbantoğlu, S. (2003). Niğde yöresinde koyun ve keçilerde *Babesia ovis*' in prevalansı. *Türkiye Parazitol Derg*, 27:18-20.
- Karatepe, M., Karatepe, B., Duzgun, A., Cicek, H. (2005). Ovine babesiosis in the Amasya province, Turkey. *Turkey. Indian Vet J*, 82(3): 248-250.

- Karatepe, M., Karatepe, B. (2016). Babesiosis. In: Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları, Ed.: M.Ali Özcel, 778-785, *Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını* No: 24, İzmir.
- Kaufmann, J. (1996). Parasitic infections of domestic animals: a diagnostic manual. Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin.
- Klinger, C.M., Nisbet, R.E., Ouologuem, D.T., Roos, D.S., Dacks, J.B. (2013). Cryptic organelle homology in apicomplexan parasites: insights from evolutionary cell biology. *Curr Opin Microbiol*, 16(4): 424-431.
- Kocabeyoğlu, Z.E. (2009). Kahramanmaraş yöresinde keçilerde görülen Babesia ve Theileria Türlerinin Reverse Line Blotting yöntemiyle araştırılması, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 67s, Kayseri.
- Kose, O. (2017). Burdur Yöresinde Ruminantlarda Theileria ve Babesia Türlerinin Reverse Line Blot Hibridizasyon Tekniği ile Araştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 270s, Burdur.
- Kuttler, K.L. (1981). Chemotherapy of babesiosis: A review. In: *Babesiosis*, Ed.: Ristic M, Kreier JP, Academic Press, New York, p.: 65-85,
- Lempereur, L., Beck, R., Fonseca, I., Marques, C., Duarte, A., Santos, M., Antunes, S. (2017). Guidelines for the detection of Babesia and Theileria parasites. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 17(1): 51-65.
- Levine, N.D. (1985). Veterinary Protozoology. 1th Ed., Iowa State University Press Ames, sy. 291-312.
- Lew, A. E., Dluzewski, A.R., Johnson, A.M., Pinder, J.C. (2002). Myosins of Babesia bovis: molecular characterisation, erythrocyte invasion, and phylogeny. *Cell Motil Cytoskeleton*, 52(4): 202-220.
- Liu, A. H., Yin, H., Guan, G. Q., Schnittger, L., Liu, Z. J., Ma, M. L., Luo, J. X. (2007). At least two genetically distinct large Babesia species infective to sheep and goats in China. *Vet Parasitol*, 147(3-4): 246-251.
- Lobo, C. A., Rodriguez, M., Cursino-Santos, J. R. (2012). Babesia and red cell invasion. *Curr Opin Hematol*, 19(3): 170-175.
- Lu, Y., Guan, G., Jiang, T., Li, Y., Yang, J., Liu, G., Luo, J., Yin, H., Liu, Z. (2015). Development of an immunochromatographic strip for the serodiagnosis of Theileria infection in sheep. *Parasit Vectors*, 8: 621.
- Luo, J., Yin, H. (1997). Theileriosis of sheep and goats in China. *Tropical animal health and production*, 29(4), 8S-10S.
- Maharana, B.R., Tewari, A.K., Saravanan, B. C., Sudhakar, N.R. (2016). Important hemoprotozoan diseases of livestock: Challenges in current diagnostics and therapeutics: An update. *Veterinary world*, 9(5): 487.
- Mehlhorn, H., Raether, W., Schein, E., Weber, M., Uphoff, M. (1986). Licht-und elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Entwicklungszyklus und Einfluss von Pentamidin auf die Morphologie der intraerythrocytären Stadien von Babesia microti. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 93, 400-405.
- Merdivenci, A. (1969). Türkiye Keneleri Üzerine Araştırmalar. Kurtulmuş Matbaası, İstanbul.
- MGM, (2020). T.C. Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği Bakanlığı, Meteoroloji Genel Müdürlüğü, İstasyonlara ait Uzun Yıllar Tüm Parametreler Bülteni (2013-2020).

- Mimioğlu, M., Göksu, K., Sayın, F. (1969). Veteriner ve Tıbbi Protozooloji. 2 Cilt, Ankara. Üniv Vet Fak Yay, Ankara 248.
- Mimioğlu, M. (1985). Theileriosis' in Tarihçesi, 4. Ulusal Parazitoloji Kongresi Bildiri Kitabı, Uludağ Üniversitesi Bursa 24-26 Eylül 1; ss. 1-4.
- Morrison, W.I., MacHugh, N.D., Lalor, P.A. (1996). Pathogenicity of Theileria parva is influenced by the host cell type infected by the parasite. *Infect Immun*, 64(2): 557-562.
- Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacamu, G., J Canto, G. (2012). Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Curr Med Chem*, 19(10): 1504-1518.
- Nagore, D., Garcia-Sanmartin, J., Garcia-Pérez, A. L., Juste, R.A., Hurtado, A. (2004). Identification, genetic diversity and prevalence of Theileria and Babesia species in a sheep population from Northern Spain. *Int J Parasitol*, 34(9): 1059-1067.
- Norval, R.A.I., Perry, B.D., Young, A.S. (1992). The Epidemiology of Theileriosis in Africa. Academic Press, London, s: 68-84.
- Ozer, E., Erdogmus, S.Z., Koroglu, E. (1993) Malatya ve Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kan parazitleri ve yayılışları. *Turk J Vet Am Sci*, 17(3):209-215.
- Ozkoc, Ü. (1979). Koyunlarda Babesia ovis (Babes, 1892) enfeksiyonunun indirek floresan antikor tekniği ile serolojik teşhisi üzerine araştırma. *Pendik Vet Kont Araş Enst Derg*, 2: 70-83.
- Ozubek, S., Aktas, M. (2017a). Molecular and Parasitological Survey of Ovine Piroplasmosis, Including the First Report of Theileria annulata (Apicomplexa: Theileridae) in Sheep and Goats from Turkey. *J Med Entomol*, 54(1): 212–220.
- Ozubek, S., Aktas, M. (2017b). Molecular evidence of a new Babesia sp. in goats. *Vet Parasitol*, 233: 1-8.
- Purnell, R.E. (1981). Babesiosis in various hosts. *Babesiosis*, 25-64.
- Ramos, C.A., Araújo, F.R., Souza, I.I., Bacanelli, G., Luiz, H. L., Russi, L. S., Alves, L.C. (2011). Real-time polymerase chain reaction based on msa2c gene for detection of Babesia bovis. *Vet Parasitol*, 176(1): 79-83.
- Rodriguez, A. E., Schnittger, L., Tomazic, M. L., & Florin-Christensen, M. (2013). Current and prospective tools for the control of cattle-infecting Babesia parasites. *Protozoa: Biology, Classification and Role in Disease; Castillo, V., Harris, R., Eds*, 1-44.
- Romero-Salas, D., Mira, A., Mosqueda, J., García-Vázquez, Z., Hidalgo-Ruiz, M., Vela, N. A. O., Schnittger, L. (2016). Molecular and serological detection of Babesia bovis- and Babesia bigemina-infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. *Vet Parasitol*, 217: 101-107.
- Saraylı, H., İnci, A., İca, A., Yıldırım, A., Düzlu, O. (2006). Yeşilhisar yöresindeki koyun ve keçilerde Babesia etkenlerinin Reverse Line Blotting (RLB) yöntemiyle araştırılması. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 15(3):181-188.
- Sayın, F., Dincer, S., Karaer, Z., Çakmak, A., Yukarı, B.A., Eren, H., Deger, S., Nalbantoğlu, S. (1997). Status of tick-borne diseases in sheep and goats in Turkey. *Parassitologia*, 39:153-156.
- Sayın, F., Nalbantoğlu, S., Yukarı, B. A., Çakmak, A., Karaer, Z. (2009). Epidemiological studies on sheep and goat Theileria infection. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 56:127-

- Schnittger, L., Yin, H., Gubbels, M.J., Beyer, D., Niemann, S., Jongejan, F., Ahmed, J.S. (2003). Phylogeny of sheep and goat *Theileria* and *Babesia* parasites. *Parasitol Res*, 91(5): 398-406.
- Schnittger, L., Yin, H., Qi, B., Gubbels, M.J., Beyer, D., Niemann, S., Ahmed, J.S. (2004). Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. *Parasitol Res*, 92(3): 189-196.
- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., Morrison, D. A. (2012). Babesia: a world emerging. *Infect Genet Evol*, 12(8): 1788-1809.
- Sevinc, F., Dik, B. (1996). Konya yöresindeki koyunlarda *Babesia ovis*'in ELISA ile teşhisi. *Veteriner Bilimleri Dergisi* 12(2): 73-79.
- Sevinc, F., Sevinc, M., Ekici, O.D., Yildiz, R., Isik, N., Aydogdu, U. (2013). *Babesia ovis* infections: Detailed clinical and laboratory observations in the pre-and post-treatment periods of 97 field cases. *Vet Parasitol*, 191(1-2): 35-43.
- Sevinc, F., Zhou, M., Cao, S., Ceylan, O., Aydin, M. F., Sevinc, M., Xuan, X. (2018). Haemoparasitic agents associated with ovine babesiosis: A possible negative interaction between *Babesia ovis* and *Theileria ovis*. *Vet Parasitol*, 252:143-147.
- Shaw, M.K. (1997). The same, but different: the biology of *Theileria* sporozoite entry into bovine cells, *Int. J. Parasitol*, 27: 457-474.
- Shaw, M.K. (2003). Cell invasion by *Theileria* sporozoites, *Trends Parasitol*, 19(1): 2- 6.
- Smith, T., Kilborne, F.L. (1893). Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever, 8th and 9th Repts. *Bur. Anim. Industr., U.S. Dept. Agric*, 177-304.
- Soulsby, E.J.L. (1986). Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Baillare Tindall, London.
- Starcovici, C. (1893). Bemerkungen u"ber den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krakheiten, die seuchenhafte Ha"moglobinurie des Rindes (Babes), dans Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). *Zbl. Bakt., I. Abt*, 14:1-8.
- Tasci, S. (1989). Van bölgesinde sığır ve koyunlarda görülen kene türleri ile bunların taşıdığı kan parazitleri (Protozoon) arasındaki ilişkiler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, 36(1):53-63.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L. (2016). Veterinary Parasitology. Fourth Edition, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- TUİK, (2020). Hayvansal Üretim İstatistikleri. Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK), Yayın No: Aralık-2020-37207, Ankara.
- Uilenberg, G. (1981). Theilerial species of domestic livestock. In *Advances in the Control of Theileriosis* Springer, Dordrecht, pp: 4-37).
- Uilenberg, G. (1995). International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Vet Parasitol*, 57(1-3): 19-41.
- Uilenberg, G. (2001). Babesiosis. In: Service MW (ed) *Encyclopedia of arthropod-transmitted infections of man and domesticated animals*. CABI, Wallingford, sy. 53-60.
- Uilenberg, G. (2006). Babesia—a historical overview. *Vet Parasitol*, 138(1-2): 3-10.

- Werling, D., Hope, J.C., Howard, C.J., Jungi, T.W. (2004). Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology*, 111: 41-52.
- Wenyon, C.M. (1926). Protozoology. vol 3, Hafner Publishing Company, New York
- Visser, A. E., Abraham, A., Sakyı, L. J. B., Brown, C. G. D., Preston, P. M. (1995). Nitric oxide inhibits establishment of macroschizont-infected cell lines and is produced by macrophages of calves undergoing bovine tropical theileriosis or East Coast fever. *Parasite Immunol*, 17(2): 91-102.
- Yin, H., Schnittger, L., Luo, J., Seitzer, U., & Ahmed, J. S. (2007). Ovine theileriosis in China: a new look at an old story. *Parasitol Res*, 101(2): 191-195.
- Yin, H., Liu, Z., Guan, G., Liu, A., Ma, M., Ren, Q., Luo, J. (2008). Detection and differentiation of *Theileria luwenshuni* and *T. uilenbergi* infection in small ruminants by PCR. *Transbound Emerg Dis*, 55(5-6): 233-237.
- Yokoyama, N., Okamura, M., Igarashi, I. (2006). Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Vet Parasitol*, 138(1-2): 22-32.
- Zhou, M., Cao, S., Sevinc, F., Sevinc, M., Ceylan, O., Ekici, S., Iguchi, A. (2017). Molecular detection and genetic characterization of *Babesia*, *Theileria* and *Anaplasma* amongst apparently healthy sheep and goats in the central region of Turkey. *Ticks Tick Borne Dis*, 8(2): 246-252.