

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

**MALATYA YÖRESİNDE
SIĞIRLARDAN ANAPLASMA TÜRLERİNİN
REVERSE LİNE BLOTTİNG (RLB)
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Serdar ÇOLAK
2020**

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK

Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Münir AKTAŞ

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Münir AKTAŞ

Prof.Dr. Cem Ecmel ŞAKİ

Prof.Dr. Armağan Erdem ÜTÜK



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Serdar ÇOLAK

Tarih

İmza

Prof. Dr. Münir AKTAŞ

Danışman

Parazitoloji Anabilim Dalı

ELAZİĞ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerini benimle paylaşan ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Münir AKTAŞ başta olmak üzere Parazitoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında katkı sunan Doç. Dr. Sezai ÖZÜBEK ve Arş. Gör. Mehmet Can ULUÇEŞME'ye, tez çalışmamı maddi olarak destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (FÜBAP, Proje No: VF.19.02) teşekkür ederim. Ayrıca bugünlere gelmemi sağlayan anne ve babama, destekleri ve sabrından ötürü eşime ve çocuklarıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Onay Sayfası	ii
Etik Beyan.....	iii
Teşekkür.....	iv
İçindekiler	v
Tablo Listesi.....	vii
Şekil Listesi.....	viii
Kısaltmalar Listesi.....	ix
1. Özet.....	1
2. Abstract.....	3
3. Giriş.....	5
3.1. Morfoloji.....	9
3.2. Taşınma ve Artropod Vektörler.....	9
3.3. Epidemiyoloji.....	12
3.4. Klinik Bulgular ve Patogenez.....	14
3.5. Teşhis.....	15
3.6. Tedavi.....	17
3.7. Korunma ve Kontrol.....	19
3.8. Aşılama.....	20
3.8.1. CanlıAşılar.....	20
3.8.2. Ölü Aşılar.....	21
4. Gereç ve Yöntem.....	23
4.1. Saha Çalışmaları.....	23

4.2. Laboratuvar Çalışmaları.....	25
4.2.1. DNA Ekstraksiyonu.....	25
4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	26
4.2.3. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi.....	28
4.2.4. Reverse Line Blotting.....	29
4.2.5. RLB’de Kullanılan Problar.....	30
4.2.6. DNA Dizileme.....	31
4.2.7. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	31
4.2.8. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> -like genotiplerinin moleküler karakterizasyonu ve filogenetik analiz.....	32
4.2.9. İstatistiksel Analiz.....	34
5. Bulgular.....	36
5.1. PZR ve RLB’nin Spesifitesi.....	36
5.2. Sığırlarda <i>Anaplasma</i> Türlerinin Prevalansı.....	38
5.3. DNA Dizileme ve Genetik Karşılaştırmalar.....	41
5.4. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	42
5.5. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> -like Genotiplerinin Moleküler Karakterizasyonu.....	46
5.6. Filogenetik Analiz.....	51
6. Tartışma ve Sonuç.....	54
7. Kaynaklar.....	60
8. Özgeçmiş.....	68

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Kan örneği alınan odaklar ile örneklerin odaklara dağılımı.....	25
Tablo 2: DNA amplifikasyonunda kullanılan Touch Down PZR ısı şartları.....	27
Tablo 3: Touch Down PZR Reaksiyonu İçeriği.....	28
Tablo 4: RLB’de kullanılan problemler ile nükleotit dizilimleri ve konsantrasyonları.....	31
Tablo 5: RFLP işleminde kullanılan primerler ve PZR şartları.....	32
Tablo 6: RFLP analizinde kullanılan restriksiyon enzimi ve karışımı oluşturan ürün miktarları.....	32
Tablo 7: RLB ile sığırlarda belirlenen tek ve miks enfeksiyonların dağılımı (n=200).....	39
Tablo 8: Malatya yöresinde sığırlarda <i>Anaplasma</i> türleri yönünden elde edilen RLB pozitiflik durumunun yaş ile ilişkisi.....	41
Tablo 9: <i>Anaplasma phagocytophilum</i> ’a benzeyen <i>A. phagocytophilum</i> -like genotiplerine ait 16S rRNA sekansları (598–599 bç) arasındaki nükleotit farklılıkları.....	48
Tablo 10: Bu çalışmada sığırlarda tespit edilen <i>Anaplasma phagocytophilum</i> -like 1 and 2 genotipleri ile GenBank’ta kayıtlı diğer izolatlar arasındaki yüzde benzerlik analizi.....	50

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Sığırlarda klinik enfeksiyona neden olan <i>Anaplasma</i> türleri.....	9
Şekil 2: <i>Anaplasma marginale</i> 'nin yaşam siklusu.....	11
Şekil 3: Malatya ilinde saha çalışmalarının yapıldığı odaklar.....	24
Şekil 4: Laboratuvar görüntüleri.....	35
Şekil 5: 16S8FE/B-GA1B primerleri ile elde edilen sığır <i>Anaplasma</i> tür ve gonotiplerine ait nested amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüsü.....	36
Şekil 6: <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> pozitif kan örneklerine ait RLB sonuçlarının görüntülenmesi.....	37
Şekil 7: EC9/ EC12A ve SSAP2f/SSAP2r primerleri ile elde edilen pozitif kontrol ve saha örneklerine ait nested PZR ürünlerinin jel görüntüsü.....	42
Şekil 8: <i>XcmI</i> enzimi ile yapılan restriksiyon analizi sonuçları.....	44
Şekil 9: <i>BsaI</i> enzimi ile yapılan restriksiyon analizi sonuçları.....	45
Şekil 10: Maksimum Likelihood yöntemi kullanılarak <i>Anaplasma</i> türlerinin 16S rRNA gen dizilerine dayanan filogenetik ağaç.....	52

KISALTMALAR LİSTESİ

µl	:	Mikrolitre
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DNaz	:	Deoksiribonükleaz
dNTP	:	Deoksinükleot trifosfat
ECL	:	Chemileluminecent Detection Agent
EDAC	:	1-ethyl-3 (dimethylaminopropyl) carbodimiimine
EDTA	:	Etilendiamintetra-asetik asit
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
pH	:	Potansiyel hidrojen
pmol	:	Pikomol
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RLB	:	Revers Line Blotting
RNA	:	Ribonükleik asit
RNaz	:	Ribonükleaz
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
sp.	:	Species (tür)
spp.	:	Species (türler)
SSPE	:	Standard Sodyum Fosfat EDTA
ssu rRNA	:	Small Subunit Ribosomal RNA
UV	:	Ultraviyole

1. ÖZET

Anaplasma türleri, hayvanların ve insanların sağlığını etkileyen zorunlu hücre içi riketsiyal patojenlerdir. *Anaplasma* soyu içinde çoğu hayvanlar için bazıları aynı zamanda insanlarda da patojen olan 6 bakteri tanımlanmıştır. Son zamanlarda, Japonya, Çin ve Tunus'ta *A. phagocytophilum* ile genetik olarak yakın benzerlik gösteren iki yeni tür tanımlanmıştır.

Bu çalışmada sığırlarda *Anaplasma* türlerinin varlığı ve dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için Malatya'nın Akçadağ, Arguvan ve Yazıhan ilçelerine bağlı 27 farklı işletmede klinik enfeksiyon göstermeyen 200 sağlıklı sığırdan 2019 yılında (Mart ve Ekim aylarında) EDTA'lı kan örnekleri toplanmıştır. Kanlardan ekstrakte edilen DNA'lar, reverse line blot (RLB) yöntemiyle *Anaplasma/Ehrlichia* türlerinin 16S rRNA geninin V1 değişken bölgesi yönünden taranmıştır. RLB ile %38.5 (77/200) oranında *Anaplasma* enfeksiyonları yönünden pozitiflik saptanmıştır. En yaygın türün *A. marginale* (%32.5) olduğu, bunu *A. centrale* (%5.5), *Anaplasma/Ehrlichia* catch-all (%5.5) ve *Anaplasma* sp. Omatjanne (%2.5)'nin izlediği belirlenmiştir.

Test edilen hayvanların hiçbirinde *A. phagocytophilum* ve *A. bovis* saptanmamıştır. PZR pozitif 77 amplikondan 11'i sadece *Anaplasma/Ehrlichia* catch-all proba sinyal verirken, membrandaki tür spesifik problemlerin hiçbirine sinyal vermemiştir. Bu amplikonların PZR-RFLP yöntemi ile *A. phagocytophilum*-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2 oldukları belirlenmiştir.

DNA dizileme ve filogenetik analizler RFLP verilerini doğrulamış ve Türkiye’de sığırlarda *A. phagocytophilum* ile yakından ilişkili potansiyel olarak yeni iki türün bulunduğunu göstermiştir.

Türkiye’de *A. phagocytophilum*-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2’nin bulunduğu ilk defa bu çalışmada ortaya konmuştur. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler *Anaplasma* cinsindeki genetik çeşitliliğin beklenenden çok daha fazla olduğunu ve *A. phagocytophilum* benzeri suşların sığır anaplasmosisinin ayırıcı tanısında dikkate alınması gerektiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Anaplasma phagocytophilum*-like 1 ve 2; Molecular epidemiology; 16S rRNA PCR-RFLP; reverse line blot; sığır

2. ABSTRACT

Investigation of *Anaplasma* Species in Cattle in Malatya Province by Reverse Line Blotting (RLB)

Anaplasma species are obligate intracellular rickettsial pathogens that affect the health of humans and other animals. The genus *Anaplasma* currently comprises 6 bacterial species mostly pathogenic to animals and/or human. Recently, two potentially novel species genetically related to *A. phagocytophilum* have been identified in Japan, China, and Tunisia.

The aim of this study was to determine the presence and distribution of *Anaplasma* spp. in cattle. For this purpose, EDTA blood samples were collected in 2019 (in March and October) from 200 apparently healthy cattle farmed in 27 different villages belonging to Arguvan, Yazihan, Akçadağ district in Malatya province. DNA was screened by reverse line blot assay for the presence of the hypervariable V1 region of the 16S rRNA gene of *Anaplasma/Ehrlichia* species. *Anaplasma* spp. overall infection rates were 38.5% (77/200) by RLB. The most frequently found species was *A. marginale* (32.5%), followed by *A. centrale* (5.5%), *Anaplasma/Ehrlichia* catc-all (5.5%) and *Anaplasma* sp. Omatjanne (2.5%). *A. phagocytophilum* and *A. bovis* were not detected in any of tested animals. Eleven of 77 PCR-positive amplicons gave positive signals to the catch-all probes, but did not show any response to the species-specific probes tested. PCR-RFLP based on 16S rRNA of these amplicons provided evidence for the presence of *A. phagocytophilum*-like 1 and *A. phagocytophilum*-like 2 strains. Sequencing and phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene validated RFLP

findings, and provided evidence for circulation of two potentially novel species closely related to *A. phagocytophilum* in Turkish cattle.

This is the first report of the presence of *A. phagocytophilum*-like strains in the country. These findings suggest that genetic diversity within the genus *Anaplasma* is much greater than expected, and *A. phagocytophilum*-like strains should be taken into account as differential diagnosis in bovine anaplasmosis.

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*-like 1 and 2; Molecular epidemiology; 16S rRNA PCR-RFLP; reverse line blot; cattle

3. GİRİŞ

Subtropikal iklim kuşağında yer alan Türkiye’de keneler ile nakledilen patojenler yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden klinik ve subklinik enfeksiyonlar oluşturarak hayvancılık endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (1- 3). *Anaplasma* cinsinde yer alan zorunlu hücre içi riketsial patojenlerin neden olduğu anaplasmosis, bu hastalıkların başında gelmektedir.

Anaplasma soyu içerisinde *A. marginale*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum*, *A. bovis*, *A. ovis* ve *A. platys* olmak üzere 6 tür tanımlanmıştır (4). *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum* ve *A. bovis* sığırlarda farklı derecelerde klinik enfeksiyona neden olmaktadır (5). Bu türler içerisinde *A. marginale* en patojen tür olup, sığırlarda ölümle sonuçlanan klinik enfeksiyona sebep olmaktadır (6, 7). Dünyanın birçok bölgesi, *A. marginale* yönünden endemik kabul edilmektedir (8). *Anaplasma centrale* hafif enfeksiyonlara sebep olmakta ve bundan dolayı aşı suşu olarak kullanılmaktadır (9).

Son yıllarda Rickettsiales dizisinde yer alan bakterilerin sınıflandırılmasında önemli değişiklikler olmuştur. Önceleri *Ehrlichia equi* veya *Ehrlichia phagocytophila* olarak tanımlanan tür, at ve insanların yanında sığır ve diğer ruminantlarda da tespit edilmiş ve yeniden yapılan sınıflandırmada *Anaplasma* soyuna alınarak *A. phagocytophilum* olarak isimlendirilmiştir (4). *Anaplasma* soyunda yer alan türlerin 2001 yılından itibaren geçerli olan sınıflandırılması aşağıda verilmiştir (4, 9).

Alem: *Monera*

Alt Alem: *Bacteria*

Kök: *Proteobacteria*

Sınıf: *α -proteobacteria*

Dizi: *Rickettsiales*

Aile: *Anaplasmataceae*

Soy: *Anaplasma*

Tür:

A. marginale

A. centrale

A. ovis

A. phagocytophilum

A. platys

A. bovis

Sığırlarda anaplazmoza neden olan *A. marginale* ve *A. centrale* eritrosit, *A. phagocytophilum* granülosit (çoğunlukla nötrofilleri) ve *A. bovis* ise monosit hücrelerini enfekte etmektedir (10, 11). *Anaplasma phagocytophilum* sığırların yanı sıra diğer evcil ve yabani ruminantlar, at, karnivor ve birçok kemirici ile birlikte insanları da enfekte etmektedir (10).

Konak hücre çeperine yakın bir lokalizasyon gösteren *A. marginale* enfeksiyonlarında, enfekte eritrosit içerisinde 4-8 adet etkene rastlanabilmektedir. İnkübasyon periyodu 7-60 gün arasında değişmekle birlikte ortalama 28 gündür (6). Hastalığın akut seyrettiği durumlarda eritrositlerin %70'i enfekte olabilir (6, 8). Hasta hayvanlarda iştahsızlık, kilo kaybı, depresyon, dehidrasyon, solunum

güçlüğü, vücut ısısında artış, anemi, sarılık, yavru atma, uyuşukluk ve süt veriminde azalma görülmektedir (7, 8, 11).

Genç hayvanlar hastalığa dirençli olup, tedavi edilmediğinde ölümle sonuçlanan klinik enfeksiyonlar çoğunlukla 2 yaş üzeri bireylerde görülmektedir (8). Hastalığı atlatan sığırlarda persiste enfeksiyon şekillenmekte ve bu hayvanlar yaşadıkları sürece enfeksiyon kaynağı olarak görev yapmaktadırlar (8, 12).

Dünyada çok yaygın olarak bulunan *A. centrale*, konak eritrositlerinde merkezi ya da merkeze yakın bir lokalizasyon göstermektedir. Morfolojik yapı itibarıyla *A. marginale*'ye benzer olup, genel olarak *A. marginale*'nin alt türü olarak kabul edilmektedir (4). *Anaplasma centrale* hafif enfeksiyonlara sebep olmakta ve buna bağlı olarak Latin Amerika, Afrika, İsrail ve Avustralya gibi ülkelerde *A. marginale*'nin öldürücü suşlarından kaynaklı enfeksiyonlarda canlı aşı olarak kullanılmaktadır (9, 13).

Anaplasma bovis Afrika ve Asya'da ruminantların patojeni olarak bilinmektedir (12). Bu bakterinin köpek, kedi, tavşan ve küçük yabani memelilerde de yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir (14-16). Monositlere yerleşen *A. bovis* sığırlarda genel olarak persiste enfeksiyonlara neden olmaktadır (17). Bu türden kaynaklanan klinik enfeksiyonlarda halsizlik, zayıflama, ishal, yüksek ateş, anemi, mukoz membranlarda solgunluk ve mukus salgısında artma gibi semptomlar görülmektedir (9, 17).

Granülositlere yerleşen *A. phagocytophilum* sığırların yanı sıra koyun, keçi, at, kedi, köpek, geyik, karaca, kemirgen ve insanları da enfekte eden bir bakteridir (18). Bu türden kaynaklı hastalık tablosu çiftlik hayvanlarında subklinik bir seyir

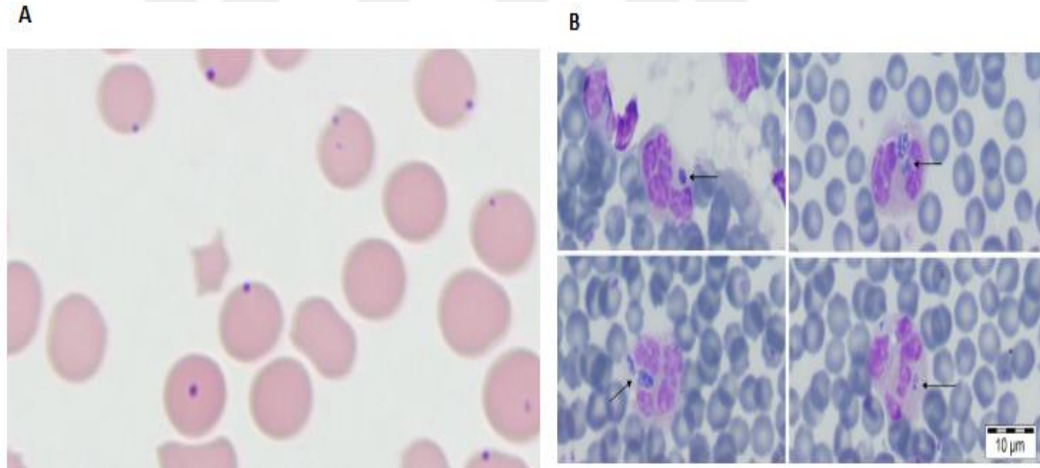
izleyebileceği gibi ağır bulgularla seyreden klinik enfeksiyona da dönüşebilmektedir. Enfekte sığırlarda genel olarak iştahsızlık, öksürük, süt veriminde azalma, kilo kaybı ve burun akıntısı gibi spesifik olmayan belirtiler görülmektedir (11).

Anaplasma phagocytophilum'un neden olduğu granülositik anaplazmoz üzerine artan çalışmalara rağmen, bu bakterinin moleküler epidemiyolojisi ve genetik çeşitliliği hakkında bilgi eksikliği bulunmaktadır. Japonya'da *A. phagocytophilum* olarak tanımlanan *Anaplasma* spp. genotiplerinin sığır, sika geyiği gibi memeliler ile bazı ixodid kenelerinde bulunduğu bildirilmiştir (19-22). Japonya'da bildirilen bu suşların 16S rRNA, groEL ve gltA genlerine dayanan filogenetik analiz, bunların Avrupa ve ABD'deki sığırlarda klinik hastalığa neden olan *A. phagocytophilum* ile ilişkili ancak *A. phagocytophilum*'dan farklı bir grup oluşturduğunu ortaya koymuştur (23, 24). Bundan dolayı, *Anaplasma* spp. strains olarak bildirilen bu genotiplerin *A. phagocytophilum* ile yakından ilişkili yeni bir *Anaplasma* türü olarak sınıflandırılması önerilmiştir (23). Yine son zamanlarda Çin'de *A. phagocytophilum* ile yakından ilişkili yeni bir *Anaplasma* spp. suşu *Hyalomma asiaticum* ve küçük geviş getiren hayvanlarda bildirilmiştir (25). Çin'deki bu yeni genotiplerin Japonya'da bildirilen genotipler de dahil olmak üzere diğer tüm sınıflandırılmış ve sınıflandırılmamış *Anaplasma* türlerinden filogenetik olarak farklı olduğu belirlenmiştir (25, 26). Son çalışmalarda, hem Japonya'da hemde Çin'de bildirilen yeni geotiplerin Tunus'ta sığır, koyun, keçi ve *Rhipicephalus turanicus*'ta (27, 28), İtalya'da ise koyun ve keçilerde bulunduğu rapor edilmiştir (29). Ben Said ve ark. (27, 28) tarafından PZR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemi ile yapılan çalışmalarda,

Japonya ve Çin’de bildirilen suşlar sırasıyla *A. phagocytophilum*-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2 olarak adlandırılmıştır.

3.1. Morfoloji

Anaplasma türleri zorunlu hücre içi gram negatif bakterilerdir. Morfolojik olarak, küçük pleomorfik şekillerde ve 0,3–2,5 µm çapında olup, konak hücrelerinde membranla çevrili intrastoplazmik bir vakuol içerisinde bulunmaktadır. Eritrositlere yerleşen *A. marginale* küçük koyu bir nokta şeklinde görünürken (Şekil 1A), nötrofillere yerleşen *A. phagocytophilum* çok sayıda bireysel organizma içeren yoğun veya gevşek yapıli inklüzyonlar halinde bulunmaktadır (Şekil 1B).



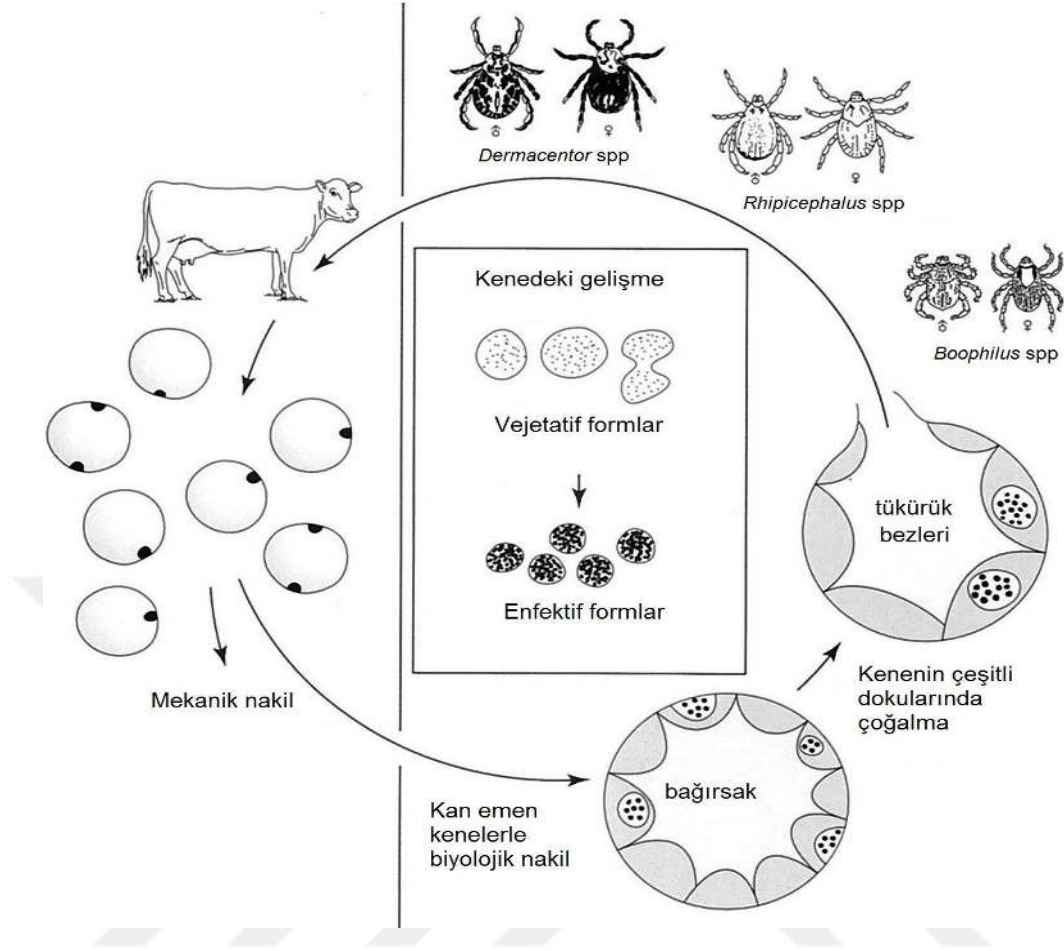
Şekil 1: Sığırlarda klinik enfeksiyona neden olan *Anaplasma* türleri. A, *Anaplasma marginale* (original); B, *Anaplasma phagocytophilum* (11).

3.2. Taşınma ve Artropod Vektörler

Sığırlarda anaplazmoza neden olan türler Ixodidae ailesine bağlı kene türleri ile biyolojik, *Tabanus* ve *Stomoxys* gibi kan emen sineklerle de mekanik olarak nakledilmektedir (10, 30). Ayrıca mekanik bulaşma enjektör iğneleri,

burun maşası, kastrasyon, boynuz kesme ve kulak etiketleme aletleri gibi kontamine olmuş ekipmanlar vasıtasıyla da gerçekleşmektedir (1, 6).

Son araştırmalar, *A. marginale*'nin taşınmasında biyolojik naklin, *Stomoxys calcitrans* tarafından gerçekleştirilen mekanik nakilden daha etkin olduğunu göstermiştir (31). Bununla birlikte, bazı *A. marginale* suşlarının keneler için enfektif olmadığı da bildirilmiştir (30). Sığırlarda *A. marginale*'nin enfekte ettiği bilinen tek hücre eritrositlerdir. Munderloh ve ark. (32) sığır endotel hücrelerinin de enfekte edildiğini bildirmiş, ancak bu durum daha sonra kanıtlanamamıştır. Sığır eritrositlerinde bir membranla çevrelenmiş ve 4-8 riketsia içeren inklüzyonlar şeklinde bulunurlar ki bunlar başlangıç cisimcikleri (initial bodies) olarak da isimlendirilirler. Akut enfeksiyon sırasında eritrositlerin %70'ten fazlası başlangıç cisimcikleri tarafından enfekte edilir (33). Akut ya da persiste enfekte konaktan kan emerken alınan etkenler, vektör kenenin bağırsak epitel hücrelerinde çoğalarak başlangıçta vegetatif formlar, daha sonra vegetatif formların ikiye bölünmesi sonucunda yüzlerce organizma içerebilecek büyük koloniler meydana gelir. Kenenin diğer dokuları ile birlikte tükürük bezlerine yerleşen bu etkenler, kan emme esnasında tükürük salgılarıyla birlikte konağa aktarılır (Şekil 2) (6, 8, 34).



Şekil 2: *Anaplasma marginale*'nin yaşam siklusu (8).

Ixodidae ailesine bağlı yaklaşık 20 kene türünün *A. marginale*'nin taşınmasında biyolojik vektör olduğu bilinmektedir (30). *Anaplasma phagocytophilum* Kuzey yarım kürede *Ixodes persulcatus* grubunda yer alan keneler, Avrupa'da ise *I. ricinus* tarafından nakledilir (10). *Anaplasma marginale* keneler tarafından transstadial veya intrastadial olarak nakledilir, transovarial nakil söz konusu değildir (6, 10).

Transstadial nakilde *Dermacentor* ve *Rhipicephalus* soylarında yer alan üç konaklı keneler, bir gelişme safhasında enfekte hayvandan kan emerken aldığı

etkeni diğerk gelişme safhasında (larvadan nimfe ya da nimften erişkine) kan emdiği duyarlı konağı aktarmaktadır (35).

İntrastadial nakil ise bir konaktan diğerk bir konağı geğeren erişkin erkek keneler tarafından gerçekleştirilmektedir (36, 37). *Anaplasma marginale*'nin İsrail, Orta Amerika, Güney Amerika ve Meksika'da *Rhipicephalus annulatus* tarafından nakledildiğı de gösterilmiştir (38). Ayrıca hem *A. marginale* hem de *A. centrale*'nin intrauterin yolla akut enfekte ineklerden doğan buzağılara bulaşabildiğı rapor edilmiştir (39).

3.3. Epidemiyoloji

Anaplazmoz tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygın olarak görülmekte ve sığır endüstrisi için büyük tehdit oluşturmaktadır. Hastalık Meksika, ABD, Orta ve Güney Amerika ve Karayip Adaları'nda endemik seyir göstermekle birlikte, *A. marginale*'nin seroprevalansı bu ülkeler hatta ülkelerdeki bölgeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Bu değışkenlik coğrafi olarak stabil veya instabil alanların oluşmasına katkıda bulunmaktadır (8).

Son yıllarda kontrolsüz veya kontrollü hayvan hareketleri, *A. marginale*'den kaynaklı sığır anaplazmozunun geniş alanlara yayılmasına neden olmuştur. Bu duruma persiste enfekte sığırlardan kaynaklı mekanik bulaşmanın neden olduğu ileri sürülmüştür (8). Anaplazmozun dağılımının vektör kene hareketliliğini etkileyebilecek küresel ısınma nedeniyle değışmeye devam edeceği düşünülmektedir (40). Sağlık ve risk değerkendirme metodolojisinde önerilen protokoller, gelecekteki küresel hayvan ticareti pazarında anaplasmosis gibi hastalıkların yayılmasını kontrol etmek için önemli olacaktır (41).

Türkiye’de theileriosis ve babesiosis ile kıyaslandığında sığır anaplazmozunun epidemiyolojisi ile ilgili bilgiler sınırlı olmakla birlikte son yıllarda bu hastalığa neden olan türlerin varlığı ve prevalansı ile ilgili çalışmalarda artış olduğu dikkati çekmektedir.

Kan frotilerinin mikroskopik muayenesine dayanan bir çalışmada, *A. marginale* ve *A. centrale*’nin varlığı bildirilmiştir (42). Yine Aydın yöresinde yapılan bir çalışmada, her iki *Anaplasma* türü moleküler olarak tespit edilmiştir (43). Afyon yöresinde bir sığırcılık işletmesinde özellikle üç yaşın üzerindeki hayvanlarda *A. marginale*’den kaynaklı akut anaplazmoz vakalarının görüldüğü, aynı işletmede 506 hayvanın 312 (%61,66)’sinde cELISA ile *A. marginale*’ye karşı şekillenen antikorlar tespit edilmiştir (44, 45). Aynı yöntemle Ege bölgesinde %55,35 (46), Kars yöresinde %52,1 (47), Bursa ilinde %45,9 (48), Karadeniz bölgesinde %37,8 (49), Van, Muş, Siirt ve Diyarbakır illerinde %28,6 oranında seropozitiflik belirlenmiştir (50). Konya’nın Kadınhanı, Çumra ve Beyşehir ilçelerinde 700 sığırdan toplanan örnekler mikroskopik bakı ve cELISA yöntemleri ile *A. marginale* yönünden incelenmiş ve sırası ile %11,29 ve %31,86 oranında pozitiflik saptanmıştır (51).

Adana’da *Anaplasma* spp. prevalansını belirlemek için yapılan bir çalışmada, cELISA ve Nested-PCR yöntemleri kullanılmıştır. İncelenen 187 sığırın 72 (%38,5)’sinde seropozitiflik saptanırken, *A. marginale* ve *A. centrale*’nin moleküler prevalansı sırası ile %3,2 (6/187) ve %1,6 (3/187) olarak tespit edilmiştir (52). Karadeniz bölgesinde yapılan moleküler bir çalışmada, *A. phagocytophilum*’un sığır ve koyunlarda bulunduğu ortaya konmuştur (53).

Aktaş ve ark. (54) Karadeniz Bölgesinde insanlardan toplanan *I. ricinus*'un nimf ve erişkinlerinde *A. phagocytophilum* türünün varlığını ortaya koymuşlardır. Aktaş ve Özübek (11) *A. phagocytophilum*'un Karadeniz bölgesinde sığırlarda klinik enfeksiyona neden olduğunu rapor etmişlerdir.

3.4. Klinik Bulgular ve Patogenezi

A. marginale'den kaynaklı sığır anaplazmozunu genellikle hemoglobinemi ve hemoglobinüri görülmeden hafif veya şiddetli anemi ve ikterus bulguları ile seyreden bir hastalıktır (6). Enfekte sığırlarda klinik bulgu olarak anemi ve ikterus ile birlikte ateş, kilo kaybı, uyuşukluk, süt veriminde azalma ve genellikle 2 yaşın üzerindeki hayvanlarda ölümler görülmektedir (7, 8, 30). Eritrositlerin fagositozu sonucu şekillenen anemi enfekte hayvanlarda en göze çarpan klinik bulgudur. Diğer klinik belirtilerin şiddeti anemi derecesi ile ilişkilidir (6). İkterus genellikle hastalığın ilerleyen dönemlerinde gelişmekte ve çoğunlukla iyileşme sırasında görülmektedir. Ağır enfekte sığırlarda dehidratasyon ve kilo kaybı ile ilişkili gastrointestinal atoni, rumen stazı ve kabızlık gelişir. Bazı hayvanlar, serebral anoksinin ataklarına atfedilen nörolojik belirtiler gösterebilir (6).

Hastalık perakut, akut, kronik ve hafif olmak üzere farklı klinik formlarda seyreder. Her yaşta sığır *A. marginale* ile enfekte olabilir, ancak hastalığın şiddeti konağın yaşına bağlıdır. Genel olarak bir yaşına kadar olan sığırlarda hafif, 2-3 yaş arasında akut ve öldürücü, 3 yaşın üstünde ise perakut ve öldürücü bir seyir gösterir. Altı aylık buzağılarda da enfeksiyon görülür, ancak nadiren klinik bulgular ortaya çıkar (55). Enfeksiyonun başlangıcında enfekte eritrosit sayısının yaklaşık her 24 saatte bir iki katına çıktığı geometrik bir artış fazı vardır (56).

Bu akut enfeksiyon fazında, enfekte eritrosit sayısı oldukça yüksektir (10^9 hücre/ml) (57).

Anaplasma suşuna ve konağın duyarlılığına bağlı olarak, akut fazda eritrositlerin enfekte edilme oranı %10-%90 arasında değişmektedir (58). Akut enfeksiyonu atlatan sığırlarda, düşük parazitemi ile karakterize persiste enfeksiyonlar gelişir (59).

Anaplasma phagocytophilum'un neden olduğu anaplazmoz başta koyunlar olmak üzere ruminantların tick-borne fever (TBF) hastalığı olarak bilinir (60). Salgınların çoğu hayvanların kene ile enfekte alanlara sokulduktan hemen sonra ortaya çıkar (61). Hastalık sığırlarda 10-14 günlük bir kuluçka döneminden sonra yüksek ateş, iştahsızlık, kilo kaybı, öksürük, burun akıntısı ve süt veriminde azalma gibi bulgularla kendini gösterir (10, 11).

Anaplasma phagocytophilum'un farklı suşlarına göre değişmek üzere sığırlardaki en yoğun bakteriyemi döneminde, granülositlerin %90'ı enfekte olabilir (10). Bakteriyemi döneminde etkenler nötrofil, eozinofiller ve monositlerde bulunur, enfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde monosit hücrelerinin istilası baskın hale gelir (62). Enfekte sığırlarda bakteriyemi dönemi yaklaşık 7 gün sürer ve bu dönemde 41°C 'ye çıkan yüksek ateş görülür (62).

3.5. Teşhis

Hastalığın tanısı, mevsim ve vektör kene dağılımı göz önünde bulundurularak enfekte hayvanlarda gözlenen klinik belirtiler ile nekropsi bulgularına dayanır (6). Klinik salgınlar en çok vektör kaynaklı bulaşmanın daha yaygın olduğu sıcak ve yağışlı mevsimlerde görülür. Endemik olmayan

bölgelerdeki kültür ırkı sığırlar, endemik bölgeden taşıyıcı bir hayvanın sokulmasının ardından klinik enfeksiyona yakalanır (63).

Klinik enfekte hayvanlarda hastalığın teşhisi, Giemsa ile boyalı frotilerin mikroskopik muayenesi ile yapılabilir. Ancak bu metod, asemptomatik ve taşıyıcı hayvanların belirlenmesinde güvenilir değildir.

Taşıyıcı hayvanların belirlenmesinde serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla complement fixation (CF), capillary agglutination, card agglutination (CAT), indirect fluorescent antibody (IFA), enzymelinked immunosorbent assays (ELISA) gibi çok sayıda serolojik test geliştirilmiş ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmıştır. Günümüzde hastalığın serolojik teşhisinde cELISA ve CAT testleri tercih edilmektedir (55). Halen, Knowles ve ark. (64) tarafından geliştirilen ve sığır anaplazmozunun teşhisinde kullanılan cELISA, *A. marginale*, *A. centrale* ve *A. ovis*'in MSP5 genini tanıyan bir monoklonal antikor (Mab-ANAF16C1) tabanlı testtir. Ticari olarak mevcut (VMRD, Inc. Pullman, WA, ABD) bu testin, enfekte sığırlarda *A. phagocytophilum* antikorlarını da tanıyabildiği gösterilmiştir (65).

Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmelerle birlikte, hastalık etkenlerinin DNA'sını belirleme prensibi ile çalışan ve taşıyıcı hayvanlarda düşük enfeksiyon seviyelerini tespit edebilen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) bazı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemin bir mikrolitre kanda 24 enfekte eritrositi (% 0.0001 enfekte eritrosite eşdeğer) belirlediği bildirilmiştir (66). Gerçek zamanlı PZR (Real time PCR) yöntemi, enfekte sığırların kanındaki *A. marginale* DNA'sının saptanması ve miktarının belirlenmesinde başarıyla uygulanmıştır (67).

Daha sonra hayvanlarda bulunabilecek aynı gruptaki bütün patojenleri bir defada ve tek işlemde ortaya koyabilen Reverse Line Blotting (RLB) tekniği geliştirilmiştir.

PCR ürünlerinin bir membranda ayrı sıralara bağlanmış özgün problara hibridizasyonu esasına dayanan bu metot, ilk defa aynı kenede bulunan dört farklı *Borrelia* türünün belirlenmesinde kullanılmıştır (68). İlerleyen zamanlarda bu yöntem, sığır, koyun ve keçi gibi ruminantlarda ve diğer birçok memeli hayvanda *Babesia*, *Theileria*, *Anaplasma* ve *Ehrlichia* soylarında bulunan türlerin teşhisinde kullanılmıştır (69-71).

3.6. Tedavi

Sığırlarda anaplazmozun antimikrobiyal tedavisi, imidokarb ve tetrasiklinlerin kullanımını içermektedir (72). Bu kimyasalların geliştirilmesinden önce, akut enfeksiyonları tedavi etmek için arsenik, antimon türevleri ve malaraya etkili çeşitli kemoterapötik ajanlar kullanılmıştır. Ancak bu bileşiklerin kemoterapötik etkisinin çok az olduğu görülmüştür (73).

Imidocarb dipropionate, yaklaşık 30 yıldan fazla bir süredir bazı bölgelerde hastalığı tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır (74). İmidokarb dipropionat *A. marginale*'den kaynaklı akut enfeksiyonlarda 2.1 mg/kg dozda deri altı veya kas içi enjeksiyon şeklinde uygulanmaktadır.

Klortetrasiklin ve oksitetrasiklin, ABD'de akut anaplazmoza karşı kullanım için onay verilen bileşiklerdir (75). Sığırlarda, 5-12 gün boyunca 11–22 mg/kg dozda damar içi yolla uygulanan oksitetrasiklinin *A. marginale* enfeksiyonlarını başarılı bir şekilde tedavi ettiği bildirilmiştir (76).

Ayrıca oksitetrasiklinin 3-7 gün aralıklarla 20 mg/kg dozda 2, 3 ya da 4 kez kas içi yolla enjeksiyonunun taşıyıcı enfeksiyonların tedavi edilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (76, 77).

Yine 1.1 mg/kg dozda klortetrasiklin katılan yem ile 120 gün, aynı ilacın 11 mg/kg dozda katılan yemlerle 30-60 gün süreyle beslenen hayvanlarda persiste enfeksiyonların başarılı bir şekilde tedavi edildiği bildirilmiştir (78). Genel olarak oksitetrasiklinler ve özellikle doksisisiklin, koyun ve sığırlarda *A. phagocytophilum*'dan kaynaklı TBF hastalığının tedavisinde etkilidir (79).

Koyun ve keçilerde yapılan deneysel çalışmalarda, *A. phagocytophilum*'un penisilin, kloramfenikol, streptomisin ve ampisilin gibi antibiyotiklere dirençli olduğu gösterilmiştir (79).

Anaplazmozun tedavisi ve daha da önemlisi sığırlarda meydana gelen persiste enfeksiyonları engellemek için yeni antimikrobiyallere ihtiyaç vardır. Bu amaçla, bakteriyel DNAGraz (Topoizomeraz II) ve Topoizomeraz IV'ü inhibe eden florokinolon grubunda bulunan enrofloksasinin bir aday olarak gösterilebileceği belirtilmiştir (80). Yapılan çalışmalarda, enrofloksasinin akut *A. marginale* enfeksiyonlarına karşı 5-10 mg/kg dozda etkili olduğu bildirilmiştir. (81). Diğer bir çalışmada ise, 48 saat arayla iki defa uygulanan 12.5 mg/kg enrofloksasinin, splenektomize buzağılarda şiddetli *A. marginale* enfeksiyonlarını iyileştirdiği, ancak iyileşen hayvanların kalıcı olarak enfekte olduğu bildirilmiştir. (82).

3.7. Korunma ve Kontrol

Anaplazmozdan korunmada planlı ve uzun süreli programların uygulanması gerekmektedir. Bu amaçla çok sayıda korunma ve kontrol stratejileri geliştirilmiş, ancak kayda değer bir gelişme olmamıştır. Korunma tedbirleri coğrafi bölgelere göre değişmekle birlikte akarisit kullanarak artropodlarla mücadele, profilaktik antibiyotik uygulamaları ve aşılamaı içermektedir. Artropodlara karşı akarisit uygulamaları *A. marginale*'nin mekanik bulaşmasından dolayı, bu etkenden kaynaklı anaplazmozun kontrol altına alınmasında kısmi bir koruma sağlamaktadır (8). Kene ve sinek enfestasyonlarını engellemek için akarisit uygulamaları yoğun emek gerektiren pahalı bir yöntemdir. Çevre kirliliği yanında tekrar eden akarisit uygulamaları dirençli kene ve sinek populasyonlarının gelişmesine de neden olabilmektedir (55).

Sığır anaplazmozunun kontrolünde antimikrobiyal tedavi, tetrasiklin grubu ilaçlar ve imidokarbın (72) yanı sıra, dünyanın bazı bölgelerinde, çeşitli kemoterapötik ajanların (antimalaryaller ve antimon türevleri gibi) kullanımını içermektedir (83). Antimikrobiyal tedavi, aktif enfeksiyon oluşumunu önlemeye yönelik olarak vektör mevsiminde enfeksiyonun klinik etkilerini sınırlamak için sağlıklı hayvanlara veya klinik anaplazmozun (hasta hayvanlarda) tedavisine yönelik olarak uygulanmaktadır. Bu uygulama hastalığın kontrolüne katkı yapabilir, ancak pahalı ve geniş alanlarda uygulanabilir değildir. Ayrıca antibiyotiklerin yoğun olarak kullanılması, dirençli mikroorganizmaların gelişimini artırıcı riskleri de beraberinde getirmektedir (55).

Aşılama sığır anaplazmozunun kontrolü için dünya genelinde kullanılan ekonomik ve etkili bir yöntemdir. Aşı üretimi ve kullanımının tarihçesi Kocan ve

ark. (8) tarafından derlenmiştir. Anaplazmoza karşı kullanılan aşılar genel olarak canlı ve ölü aşılar olmak üzere iki grupta değerlendirilir. Her iki aşı tipi için antijen kaynağı olarak *A. marginale* ile enfekte sığır eritrositleri kullanılmaktadır. Her iki aşı da klinik hastalığı hafifletir ya da engeller, ancak hiçbiri hayvanların *A. marginale* ile persiste enfekte olmasının önüne geçemez.

3.8. Aşılama

3.8.1. Canlı Aşılar

Anaplazmozun kontrol altına alınması amacıyla canlı aşı kullanımı Sir Arnold Theiler tarafından 1900'li yılların başında başlatılmıştır (84). Canlı aşılar, sığırların daha az patojenik (zayıflatılmış) *A. marginale* veya *A. centrale* suşlarıyla enfekte olan eritrositlerle aşılmasını içerir. Bu aşılamaadaki bağışıklık tepkisi, hafif enfeksiyon geliştiren ve aşı suşu ile kalıcı olarak enfekte olan aşılanmış hayvanlardaki doğal enfeksiyona benzer (55). Aşılanan sığırlarda tipik olarak klinik hastalığa karşı ömür boyu koruma sağlayan persiste enfeksiyonlar gelişir ve dolayısı ile aşı tekrarına ihtiyaç duyulmaz (85, 86).

Sir Arnold Theiler tarafından izole edilen *A. centrale*, sığır anaplazmozunun kontrolü amacıyla kullanılan en yaygın canlı aşı suşudur (84). Afrika, Avustralya, İsrail ve Latin Amerika başta olmak üzere dünyanın çeşitli bölgelerinde kullanılmaktadır. Theiler (84), sığırlarda *A. centrale*'nin *A. marginale*'ye göre daha az patojen olduğunu ve *A. centrale* ile enfekte olan sığırlarda *A. marginale* enfeksiyonuna karşı koruyucu bağışıklık geliştiğini gözlemlemiştir. Çapraz koruyucu bağışıklığın, her iki bakteride korumada rol

oynayabilen ortak immünodominant epitopların bulunmasından kaynaklandığı ortaya konmuştur (87).

Işınlarla iradiye edilmek suretiyle elde edilen suşlar ile etken için normal konak sayılmayan koyun veya geyik gibi konaklarda üretilmesi sonucu patojenitesi zayıflatılmış suşlar canlı aşı olarak kullanılmıştır (8). Ancak, zayıflatılmış aşılarla sağlanan koruma genel olarak güvenilir bulunmamıştır (6).

3.8.2. Ölü Aşılar

Etkenlerin inaktive edilmesi yoluyla geliştirilen ölü aşılar, 1960'lı yıllardan itibaren uzun bir süre ABD'de kullanılmıştır (8). Bu tür aşılar, coğrafi türlerin çapraz koruyucu olduğu Güney Amerika ülkelerinde klinik anaplazmozun önlemede etkili olmuştur (55). Ölü aşıların canlı aşılara göre bazı avantajları vardır. Örneğin, istenmeyen enfeksiyöz ajanlarla oluşabilecek kontaminasyon riski canlı aşılara göre daha azdır. Yine saklama maliyetleri düşüktür ve genel olarak aşılama sonrası reaksiyonlar en az seviyededir. Bu aşıların canlı aşılara göre dezavantajları arasında yıllık idame aşılama ihtiyacı ile *A. marginale*'nin eritrositlerden yüksek saflaştırma maliyeti ve geniş ölçüde ayrılmış coğrafi bölgelerden elde edilen izolatlar arasındaki çapraz koruma eksikliği yer alır (6). Ayrıca, ölü aşıların sağladığı koruyucu bağışıklık genel olarak canlı aşıların sağladığı koruyucu bağışıklıktan daha azdır. Anaplazmozun kontrolü için kullanılan ilk ticari ölü aşılar antijen olarak, liyofilize edilmiş *A. marginale* ile enfekte eritrositler kullanılmış ve bu ürün uygulama sırasında yağ bazlı bir adjuvan ile birleştirilmiştir (88). Türkiye'de sığırlarda kene kaynaklı enfeksiyonların prevalansı, etiyolojileri, epidemiyolojileri ve vektör keneler ile

ilgili veriler sınırlıdır. Ülkemizin değişik bölgelerinde kan parazitleri ile ilgili mikroskopik ve serolojik yöntemlerle yapılmış araştırmalarda, bu hastalıkların yaygın olarak bulunduğu dikkati çekmektedir. Ancak, özellikle sığırlarda anaplasmosis ile ilgili moleküler metotlarla yapılmış yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, Malatya yöresindeki sığırlarda anaplazmoza neden olan türlerin varlığı ve dağılımının moleküler teknikler ile belirlenmesi amaçlanmıştır.



4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Malatya yöresinde sığırlarda anaplazmoza neden olan türlerin varlığı ve dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır. *Anaplasma* soyundaki türlerin belirlenmesinde moleküler yöntemler (polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli reverse line blot (RLB) ve PZR temelli RFLP) kullanılmış ve elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

4.1. Saha Çalışmaları

Saha çalışmaları Mart-Ekim 2019 tarihleri arasında Malatya iline bağlı Arguvan, Yazıhan ve Akçadağ ilçelerinde rastgele seçilen 27 işletmedeki sığırlar üzerinde yürütülmüştür (Şekil 3). Malatya ili, Doğu Anadolu Bölgesi'nin Yukarı Fırat Havzasında, Adıyaman, Elazığ, Bingöl, Muş ve Van çöküntü alanının güneybatı ucunda ve 35 54' ve 39 03' kuzey enlemleri ile 38 45' ve 39 08' doğu boylamları arasında yer almaktadır. Malatya'da kışların soğuk ve uzun, yazların sıcak ve kurak geçtiği sert karasal iklim hüküm sürmektedir. Yıllık sıcaklık ortalaması 13,5 °C, yağış ortalaması ise 420 mm'dir (89).



Şekil 3: Malatya ilinde saha çalışmalarının yapıldığı odaklar.

Arguvan, Yazihan ve Akçadağ ilçelerinde rastgele seçilen 27 işletmede farklı ırk (Simental, Montofon, Holstein ve bunların melezleri) ve yaşta [0-1 yaş (n = 79), 1-3 yaş (n = 59), 3 yaş ve üzeri (n = 62)] meraya çıkan toplam 200 sığırdan kan örneği alınmıştır. Örnek alınan hayvanların ırk ve yaş durumları ile örneğin alındığı odak ve tarih bilgileri ilgili protokole kaydedilmiştir. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri +4 °C'yi sağlayan termos içinde Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilmiş ve DNA ekstraksiyonu yapılncaya kadar -20°C' de muhafaza edilmiştir. Alınan örnek sayısının odaklara dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Kan örneği alınan odaklar ile örneklerin odaklara dağılımı.

Odak	İşletme Sayısı	Alınan Örnek Sayısı
Yazıhan	10	65
Arguvan	9	69
Akçadağ	8	66
Toplam	27	200

4.2. Laboratuvar Çalışmaları

4.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA ekstraksiyonu, ticari DNA izolasyon kitleri kullanılarak kit protokollerine göre yapılmıştır. Kısaca, eppendorf tüplere 200 µl kan örneği alınmış ve üzerlerine Proteinase-K ve RNase A (20 µl) ilave edilerek vortekslenmiştir. Oda ısısında 2 dakika bekletildikten sonra, 200 µl Genomic Lysis/Binding Buffer eklenip vortekslenmiş ve 55 °C’ de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra üzerlerine 200 µl %96 ethanol ilave edilip 5 saniye vortekslenmiştir. Collection tüp, Spin column’a yerleştirildikten sonra elde edilen lizat Spin column’a dökülüp 10.000 x g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Collection tüp atılmış ve yeni bir Collection tüpe yerleştirilen Spin column’un üzerine 500 µl Wash Buffer 1 eklenip 10000 x g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Lizata 500 µl Wash Buffer 2 eklenerek santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Spin column siteril eppendorf tüplerine yerleştirilip üzerlerine 100 µl Genomic Elution Buffer eklendikten sonra oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakılmış ve daha sonra 23000 x g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen genomic DNA’lar kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklanmıştır.

4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

DNA amplifikasyonu, Touch Down Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Touch Down PZR) yöntemi ile SENSOQUEST Labcylcer Gradient marka cihaz kullanılarak yapılmıştır.

Sığırlardan elde edilen DNA'lar önce EC9 (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') ve EC12A (5'-TGATCCTGGCTCAGAACGAACG-3') primerleri kullanılarak *Anaplasma/Ehrlichia* türlerinin 16S ribosomal RNA (rRNA) geninde 1462 baz çifti (bç) uzunluğunda bir bölge amplifiye edilmiştir (20).

Elde edilen PZR ürünleri kullanılarak yine *Anaplasma/Ehrlichia* türlerinin 16S rRNA geninin V1 değişken bölgesinde yaklaşık 500 bç uzunluğunda bir bölgeyi çoğaltan 16S8FE (5'-GGAATTCAGAGTTGGATCMTGGYTCAG-3') ve BGA1B (Biotin-5'-CGGGATCCCGAGTTTGCCGGGACTTCTTCT-3') primerleri ile nested PZR yapılmıştır (90). Gerek PZR amplifikasyonunda kullanılan primerler ve gerekse RLB'de kullanılan probler, "The Midland Certified Reagent (Co. Inc. A.B.D.)" firmasına sentezlettirilmiştir. PZR reaksiyonu, toplam 25 µl hacimde gerçekleştirilmiş ve her reaksiyonda, pozitif ve negatif kontrol DNA örnekleri kullanılmıştır. Pozitif kontrol DNA örneği olarak, *A. marginale* (GenBank giriş no. KX781292) ve *A. phagocytophilum* (GenBank giriş no. KP745629) için daha önce klinik enfekte sığırlardan izole edilen ve sekans analizi ile teyit edilmiş laboratuvar stoklarımızda mevcut genomik DNA'lar kullanılmıştır.

Anaplasma phagocytophilum-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2 kontrol DNA örnekleri Dr. Alberti (Mediterranean Center for Diseases Control, University of Sassari, Sassari Italy)’den temin edilmiştir. Negatif kontrol olarak, yine daha önceki çalışmalarda 3 aylık buzağıdan alınan, mikroskopik bakı ve PZR ile *Anaplasma* enfeksiyonları yönünden negatif olduğu anlaşılan kan örneğinden ekstrakte edilen genomik DNA kullanılmıştır.

DNA amplifikasyonunda kullanılan Touch Down PZR ısı şartları Tablo 2, reaksiyon içeriği ise Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 2: DNA amplifikasyonunda kullanılan Touch Down PZR ısı şartları.

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

Tablo 3: Touch Down PZR Reaksiyonu İçeriği.

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
Fovard Primer	1,25	20 pmol/μl
Template DNA	2,5	
Final Konsantrasyon	25 μl	

4.2.3. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonunda elde edilen ürünlerin bir kısmı, ethidium bromide (10mg/ml) ile 30 dakika boyanan %1,4'lük agarose jel'de, 5 μl PZR ürünü 4 μl yükleme solüsyonu (Loading Dye) ile karıştırılarak elektroforez tankındaki jel kuyucuklara yüklenmiştir.

Elektroforez işlemi, Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tampon solüsyonu kullanılarak jel tankında 100 voltta bir saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi sonrası Agorose Jel, Quantum Vilber Lourmat (Fransa) marka jel görüntüleme sisteminde spesifik bantların varlığı açısından incelenmiştir. Geri kalan ürünler ise, RLB testinde kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.2.4. Reverse Line Blotting

Biodyne-C membran üzerine, PZR ürünleri ile hibridize olacak oligonükleotitlerin bağlanması Schouls ve ark. (90) ile Bekker ve ark. (91)'nin belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Kısaca, Biodyne C membran oda ısısında 10 dakika, 10 ml %16 EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) ile aktive edildikten sonra, distile su ile yıkanarak MN45 miniblottera (Immunetics, Cambridge) yerleştirilmiştir. Membran, üzerindeki kalıntı sıvı alındıktan sonra, 500 mM NaHCO₃ (pH 8.4) ile 50-800 pmol/150µl konsantrasyonlarında sulandırılan problardan, membranın ilk ve son kanalları dışındaki tüm kanallarına 150 µl dökülmüş ve oda ısısında 1-2 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, kanallardaki sıvılar aspire edilerek uzaklaştırılmış ve membran, miniblotterden çıkarılarak 100 mM NaOH içinde inkübe edilip inaktivasyon sağlanmıştır. İnaktivasyondan sonra membran, 2X SSPE/0,1 SDS içinde 60°C'de 5 dakika yıkanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Hibridizasyon aşamasında, önceden elde edilen PZR ürünlerinden 20 µl alınarak, 2X SSPE/0,1 SDS ile 150 µl'ye tamamlanmış ve 100°C'de 10 dakika tutularak denatüre edilmiştir. Önceden dökülen prob sıraları ile miniblotter kanalları 90° açı yapacak şekilde, miniblottera yerleştirilen membran üzerindeki fazla sıvı alınıp uzaklaştırıldıktan sonra, hazırlanmış olan PZR ürünleri miniblotter kanallarına dökülmüş ve 42°C'de 1 saat bekletilerek hibridizasyon sağlanmıştır. Hibridizasyon işleminden sonra, kanallardaki sıvı alınarak membran miniblotterden çıkarılmış ve 2X SSPE/0,1 SDS solüsyonu ile 2 defa 52°C'de 10 dakika yıkanmıştır. Daha sonra 42°C'de 30 dakika, 2X SSPE/ % 0,5 SDS ile

1:4000 oranında sulandırılmış 10 ml Horseradish Peroksidaz ile işaretlenmiş streptavidin solüsyonunda hafif çalkalanıp inkübe edilmiştir. Inkübasyonu takiben membran, 2X SSPE/0,5 SDS ile 2 defa 42°C’de 10 dakika ve 2X SSPE ile 2 defa oda ısısında 5 dakika yıkanmıştır. Membran 10 ml ECL sıvısında 1 dakika inkübe edildikten sonra, sert bir zemine alınarak, üzeri asetatla örtülmüş ve hava kabarcıkları uzaklaştırılarak membran üzerine karanlık ortamda ECL hyperfilm (Amersham Biotech) konulup banyo edilmiştir. Değerlendirmede, filmler üzerinde prob ve PZR ürünlerinin döküldüğü sıraların kesiştiği kısımlarda meydana gelen siyah lekeler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

4.2.5. RLB’de Kullanılan Problar

RLB testinde kullanılan problar, 5’- uçlarında amino grubu N- (Trifluoracetamidoethyl – eyanoethyl, N, N, - diisopropyl phosporamidite (TFA)- C6 aminolinker) olacak şekilde “The Midland Certified Reagent (Co. Inc. A.B.D.)” firmasına sentezlettirilmiştir. Liyofilize halde gönderilen problar, DNaz ve RNaz içermeyen bi-distile steril su ile 100 pmol/μl konsantrasyonda sulandırılarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, membrana Catchall (*Anaplasma* ve *Ehrlichia*) ve soy spesifik (*Anaplasma* spp.ve *Ehrlichia* spp.) probların yanı sıra bugüne kadar sığırlarda tanımlanan *Anaplasma* ve *Ehrlichia* türleri ile bazı genotiplere özgü toplam 11 farklı prob bağlanmıştır. RLB testinde kullanılan problar ile bunlara ait nükleotit dizilimleri ve konsantrasyonları Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4: RLB’de kullanılan probalar ile nükleotit dizilimleri ve konsantrasyonları.

Prob	Nükleotit dizilimi (5’-3’)	Konsantrasyon (pmol/μl)	Kaynak
Catch-all (A/E)	GGGGGAAAGATTTATCGC TA	200	91
<i>A. marginale</i>	GACCGTATACGCAGCTTG	200	91
<i>A. centrale</i>	TCGAACGGACCATACGC	200	91
<i>A. bovis</i>	GTAGCTTGCTATGAGAACA	200	91
<i>Ehrlichia</i> sp. (Omatjenne)	CGGGTTTTTATCATAGCTTGC	200	91
<i>A. phagocytophilum</i> 1	TTGCTATAAAGAATAATTAGTGG	400	90
<i>A. phagocytophilum</i> 2	TTGCTATGAAGAATAATTAGTGG	400	90
<i>A. phagocytophilum</i> 3	TTGCTATAAAGAATAGTTAGTGG	400	90
<i>A. phagocytophilum</i> 4	TTGCTATAGAGAATAGTTAGTGG	400	90
<i>A. phagocytophilum</i> 5	TTGCTATAAAGAATAGTTAGTGG	400	90
<i>A. phagocytophilum</i> 7	TTGCTATAGAGAATAGTTAGTGG	400	90

4.2.6. DNA dizileme

DNA dizilemede 16S rRNA geni hedef alınmıştır. Tür spesifik proba sinyal veren (*A. marginale*) pozitif örnek 16S8FE/BGA1B, Catchall proba sinyal veren örnek ise SSAP2f/SSAP2r primerleri ile amplifiye edildikten sonra sekanslanmıştır. Bunun için, dizilimi belirlenecek izolata ait amplicon, %1,5’lik agaroz jelde görüntüledikten sonra, jel pürifikasyon kiti (QIAquick® Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) ile pürifiye edilmiş ve DNA dizilimi belirlenmiştir. Elde edilen sekansların GenBank veri tabanına kayıtları yapılmış ve BLAST programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) kullanılarak Genbank’ta kayıtlı diğer sekanslar ile karşılaştırılmıştır.

4.2.7. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Bu çalışmada, Catchall proba sinyal veren *Anaplasma* spp. pozitif örneklerin identifikasyonunda RFLP yöntemi kullanılmıştır. Bunun için Catchall proba sinyal veren DNA örnekleri önce bütün *Anaplasma/Ehrlichia* türlerinin 16S rRNA genini çoğaltan genel, daha sonra *A. phagocytophilum* ve *A.*

phagocytophilum-like genotiplerine spesifik primerler kullanılarak nested PZR'de amplifiye edilmiştir. Amplifikasyonda kullanılan primerler ile bunların nükleotit dizilimleri ve PZR şartları Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5: RFLP işleminde kullanılan primerler ve PZR şartları.

Primer	Dizilim (5'-3')	PZR Şartları	Kaynak
EC9	TACCTTGTTACGACTT	94°C 5dk, 94°C- 54°C-72°C 30 sn,	20
EC12A	TGATCCTGGCTCAGAACGAACG	72°C 5 dk	
SSAP2f	GCTGAATGTGGGGATAATTTAT	94°C 4dk, 94°C- 53.5°C-72°C 30	
SSAP2r	ATGGCTGCTTCCTTTCGGTTA	sn, 72°C 5 dk	

Nested PZR sonucunda pozitif kontrol ve saha örneklerine ait amplikonlar *XcmI* ve *BsaI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir (28). RFLP karışımı, 37°C'de 2 saat süreyle sıcak su banyosunda tutulduktan sonra %3'lük agaroz jelde 1 saat elektroforeze tabi tutulmuş ve jel görüntüleme sisteminde restriksiyon bant profilleri izlenmiştir. RFLP'de kullanılan restriksiyon enzimi ve karışımı oluşturan ürün miktarları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: RFLP analizinde kullanılan restriksiyon enzimi ve karışımı oluşturan ürün miktarları.

Malzeme	Miktar(µl)
<i>XcmI</i> restriksiyon enzim	1
10X buffer	2
Ultra safsu	7
PZR ürünü	10
Toplam	20

4.2.8. *Anaplasma phagocytophilum*-like genotiplerinin moleküler karakterizasyonu ve filogenetik analiz

Gerek RFLP sonuçlarının doğrulanması ve gerekse *A. phagocytophilum*-like genotiplerindeki varyantların belirlenmesi amacıyla, RFLP sonucunda *A.*

phagocytophilum-like 1 (n = 8) ve *A. phagocytophilum*-like 2 (n = 3) olarak identifiye edilen örneklerin 16S rRNA geninde 598-599 bp uzunluğundaki bölgenin DNA dizilimi belirlenmiştir. Elde edilen sekanslar, EMBL/GenBank veri tabanına kayıt edilmiştir.

Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) programı kullanılarak bu çalışmada elde edilen *A. phagocytophilum*-like 1 (Aplike1Bv) ve *A. phagocytophilum*-like 2 (Aplike2Bv) genotiplerine ait sekansların çoklu nükleotit hizalamaları GenBank veri tabanında kayıtlı diğer izolatlarla birlikte yapılmış ve nükleotit dizilimleri arasındaki yüzde benzerlik oranları belirlenmiştir.

Bu çalışmada tanımlanan *A. phagocytophilum*-like genotiplerine ait varyantların (Aplike1Bv ve Aplike2Bv), diğer bölgelerden bildirilen izolatlar arasındaki filogenetik ilişkileri belirlenmiştir. Eşleştirilmiş nükleotit sekansları, Geneious Prime 2020.1.1 yazılımı (<http://www.geneious.com>) kullanılarak birleştirilmiştir. Kesinleşmiş konsensüs sekansları, Geneious prime'da bulunan plug-in vasıtasıyla MUSCLE (92) kullanılarak GenBank'tan indirilen ilgili *Anaplasma* sekansları ile hizalanmıştır. *Anaplasma* genotiplerinin filogenetik ilişkisini değerlendirmek için MEGA X'te (93) uygulanan Maksimum Olabilirlik analizi (Maximum Likelihood) kullanılmıştır.

ML analizlerinde 1.000 replika ile bir bootstrap analizi yapılmıştır. ML analizleri için en uygun DNA ikame modeli, jModeltest v.0.1.1 yazılımı kullanılarak TN93 + G + I olarak belirlenmiştir (94). Çalışmada karakterize edilen temsili 16S rRNA gen dizileri, MT338502 ve MT338494 erişim numaraları ile GenBank veri tabanına girilmiştir.

4.2.9. İstatistiksel Analiz

Anaplasma türlerinin yaş grupları arasındaki görülme sıklığının değerlendirilmesinde Pearson ChiSquare (χ^2) testi kullanılmış ve % 5 ($P<0,05$) düzeyindeki bir farklılık istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Bu testler Epi info programı ile yapılmıştır.



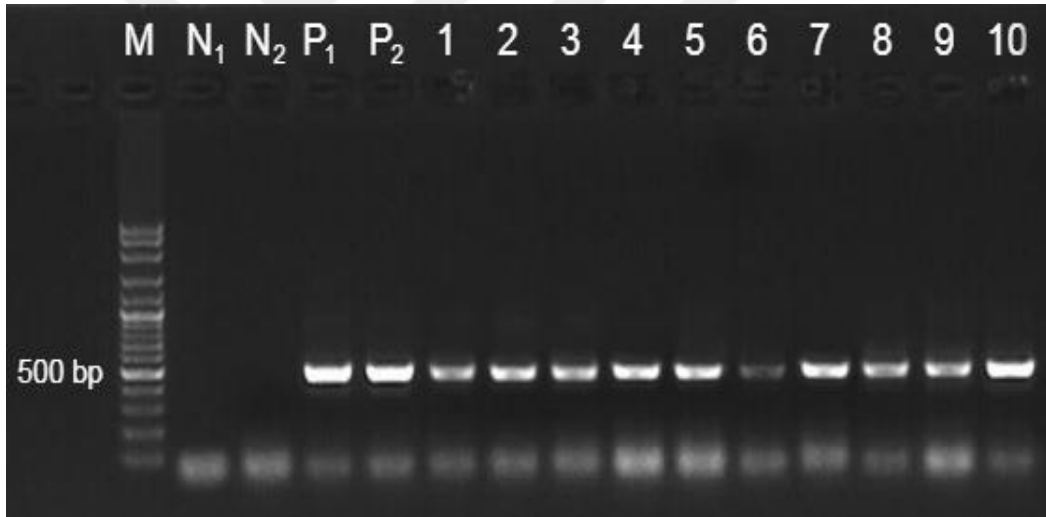


Şekil 4: Laboratuvar Görüntüleri.

5. BULGULAR

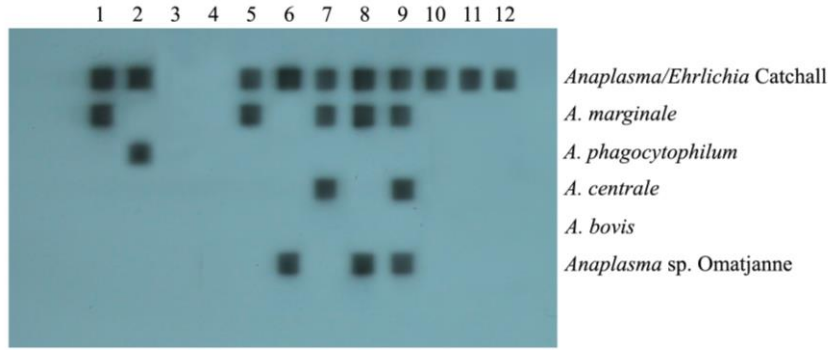
5.1. PZR ve RLB'nin spesifitesi

Gerek pozitif kontrol ve gerekse sahadan elde edilen DNA örnekleri kullanılarak 16S8FE/B-GA1B (*Anaplasma/Ehrlichia*) primerleri ile elde edilen nested PZR ürünleri elektroforez yapıldığında, beklenildiği gibi *Anaplasma* türlerine ait yaklaşık 500 bç uzunluğunda bant elde edilmiştir (Şekil 5). Bu amplikonların spesifitesi, temsili örneklerin DNA dizilemeleri yapılmak suretiyle teyit edilmiştir.



Şekil 5: 16S8FE/B-GA1B primerleri ile elde edilen sığır *Anaplasma* tür ve gonotiplerine ait nested amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüsü. M, marker (100 bç); N negatif kontrol (N1, distile su; N2, enfekte olmayan sığır genomik DNA'sı). P standart pozitif kontrol (P1, *A. marginale* GenBank giriş no. KX781292; P2, *A. phagocytophilum* GenBank giriş no. KP745629). 1-10, *Anaplasma* spp. pozitif saha örnekleri.

Gerek standart kontrol ve gerekse saha örneklerine ait PZR ürünleri, sığırlarda tanımlanan *Anaplasma* türlerine spesifik probların (*A. marginale*, *A. phagocytophilum*, *A. centrale*, *A. bovis*, *Anaplasma* sp. Omatjenne) bağlandığı membranda hibridizasyona tabi tutulmuş ve sonuçlar şekil 6’da verilmiştir.



Şekil 6: *Anaplasma/Ehrlichia* pozitif kan örneklerine ait RLB sonuçlarının görüntülenmesi. Soldan sağa örnek sıraları, yukarıdan aşağıya prob sıraları. 1-4 standart pozitif ve negatif DNA örnekleri (1, *A. marginale*; 2, *A. phagocytophilum*; 3, distile su; 4, enfekte olmayan sığır genomik DNA’sı). 5-9 bu çalışmada saha örneklerinde tespit edilen tek ve miks enfeksiyonlar (5, *A. marginale*; 6, *Anaplasma* sp. Omatjenne; 7, *A. marginale* + *A. centrale*; 8, *A. marginale* + *Anaplasma* sp. Omatjenne; 9, *A. marginale* + *A. centrale* + *Anaplasma* sp. Omatjenne).

Şekil 6’dan görüleceği üzere, RLB sonucunda *A. marginale* ve *A. phagocytophilum*’a ait pozitif kontrol DNA’larından elde edilen amplikonlar prob karşılıkları ile sinyal oluşturmuştur (Şekil 6, sıra 1 ve 2). Saha örneklerine ait PZR ürünlerinin büyük bir kısmı spesifik prob karşılıklarına sinyal vermiştir.

Bu sinyaller tek ya da miks enfeksiyonlar şeklinde *A. marginale*, *A. centrale* ve *Anaplasma* sp. Omatjenne prob karşılıklarında görülmüştür (Şekil 6, sıra 5-9). Ancak bazı saha örneklerinde sadece *Anaplasma/Ehrlichia* Catchall proba sinyal alınmıştır (Şekil 6, sıra 10-12).

5.2. Sığırlarda *Anaplasma* türlerinin prevalansı

Malatya'nın Yazıhan, Arguvan ve Akçadağ ilçelerinde *Anaplasma* türleri yönünden RLB ile incelenen 200 sığırdaki tek ve miks enfeksiyonların dağılımı Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7: RLB ile sığırlarda belirlenen tek ve miks enfeksiyonların dağılımı (n=200).

Enfeksiyon	<i>A. marginale</i>	<i>A. centrale</i>	<i>Anapalsma</i> sp. Omatjanne	<i>A.</i> <i>phagocytophilum</i>	<i>A. bovis</i>	Catc-all (<i>Anaplasma/Ehrlichia</i>)	Positif örnek sayısı (%)
Tek enfeksiyon	+	-	-	-	-	-	51 (%25.5)
	-	-	-	-	-	+	11 (%5.5)
	-	-	+	-	-	-	1 (%0.5)
Ara toplam							63 (%31.5)
Mix	+	+	-	-	-	-	10 (%5)
	+	-	+	-	-	-	3 (%1.5)
	+	+	+	-	-	-	1 (%0.5)
Ara toplam							14 (%7)
Toplam	65 (%32.5)	11 (%5.5)	5 (%2.5)	-	-	11 (%5.5)	77 (%38.5)

Tablo 7'den anlaşılağı üzere, muayene edilen 200 sığırın 77 (%38,5)'sinde *A. marginale*, *A. centrale*, *Anaplasma sp.* Omatjanne ve *Anaplasma/Ehrlichia* Catchall'dan kaynaklı tek ya da miks enfeksiyonlar tespit edilmiştir. Örneklerin 63 (%31,5)'ünde tek türden kaynaklı enfeksiyonlar belirlenirken, 14 (7%) örnekte *A. marginale*, *A. centrale* ve *Anaplasma sp.* Omatjanne kombinasyonundan oluşan miks enfeksiyonlar tespit edilmiştir. *Anaplasma marginale*'nin en yaygın tür olduğı (%32,5), bunu *A. centrale* (%5,5), *Anaplasma/Ehrlichia* Catchall (%5,5) ve *Anaplasma sp.* Omatjanne (%2,5)'nin izlediğı görölmüştür. Bir örnekte *A. marginale*, *A. centrale*, *Anaplasma sp.* Omatjanne; 3 örnekte *A. marginale*, *Anaplasma sp.* Omatjanne; 10 örnekte ise *A. marginale* ve *A. centrale* birlikte tespit edilmiştir. Örneklerin hiçbirinde *A. phagocytophilum* ve *A. bovis* saptanmamıştır (Tablo 7). RLB'de 11 örnekte sadece *Anaplasma/Ehrlichia* Catchall proba sinyal alınması bölgedeki sığırlarda *A. marginale*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum*, *A. bovis* ve *Anaplasma sp.* Omatjanne dışında başka bir *Anaplasma* tür ya da genotipin bulunduğı şeklinde değerlendirilmiştir.

Malatya yöresinde sığırlarda *Anaplasma* türlerinin yaygınlığı, hayvanların yaşları dikkate alınarak incelenmiş ve sonuçlar Tablo 8'de verilmiştir. Buradan anlaşılağı üzere, *Anaplasma* pozitiflik durumu ile hayvanın yaşı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($P = 0,797$, $\chi^2 = 0,45$).

Tablo 8: Malatya yöresinde sığırlarda *Anaplasma* türleri yönünden elde edilen RLB pozitiflik durumunun yaş ile ilişkisi.

	Yaş		
	0-1 yaş	1-3 yaş	3 yaş ve üzeri
Sayı	79	59	62
Positif	29	22	26
%	36.7	37.28	41.93
95% CI	26.13 – 48.30	25.04 – 50.86	29.51 – 55.16
P* değeri	P = 0.797		

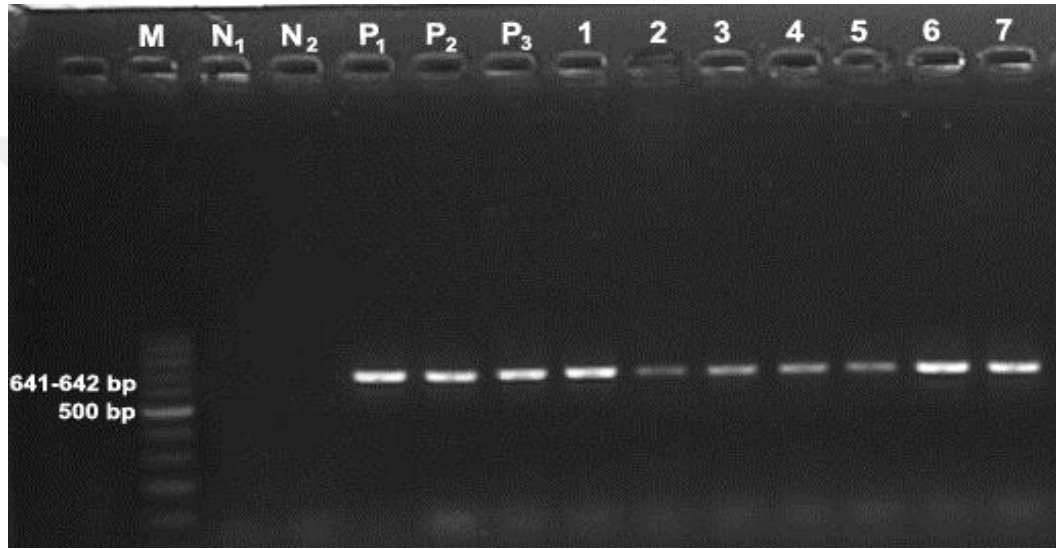
*Pearson ChiSquare (χ^2)

5.3. DNA dizileme ve genetik karşılaştırmalar

Bu çalışmada, PZR ve RLB'nin doğrulanması amacıyla RLB'de Catchall (*Anaplasma/Ehrlichia* spp.) ve tür spesifik proba (*A. marginale*) sinyal veren örnekleri temsilen seçilen 2 izolatın DNA dizilimi belirlenmiştir. *Anaplasma marginale*'ye ait sekans MT338492, Catchall proba sinyal veren örneğe ait sekans ise MT338494 giriş numaraları ile GenBank veri tabanına girilmiştir. BLAST analizi sonucunda, MT338492 giriş numaralı *A. marginale*'nin GenBank veri tabanında kayıtlı *A. marginale* (DQ000616) sekansı ile %100 benzer olduğu görülmüştür. *Anaplasma/Ehrlichia* Catchall probuna sinyal veren izolat ise (GenBank giriş no. MT338494) GenBank veritabanında *A. phagocytophilum* ve uncultured *Anaplasma* sp. olarak yayınlanan izolatlara %99.33-100 oranında benzerlik göstermiştir.

5.4. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Bu çalışmada RLB’de Catchall proba sinyal veren 11 örnek, önce EC9/EC12A genel, daha sonra *A. phagocytophilum* ve *A. phagocytophilum*-like genotiplerine (*A. phagocytophilum*-like1, *A. phagocytophilum*-like 2) özgü SSAP2f/SSAP2r primerleri ile amplifiye edilmiştir. Elde edilen nested PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 7’de verilmiştir.



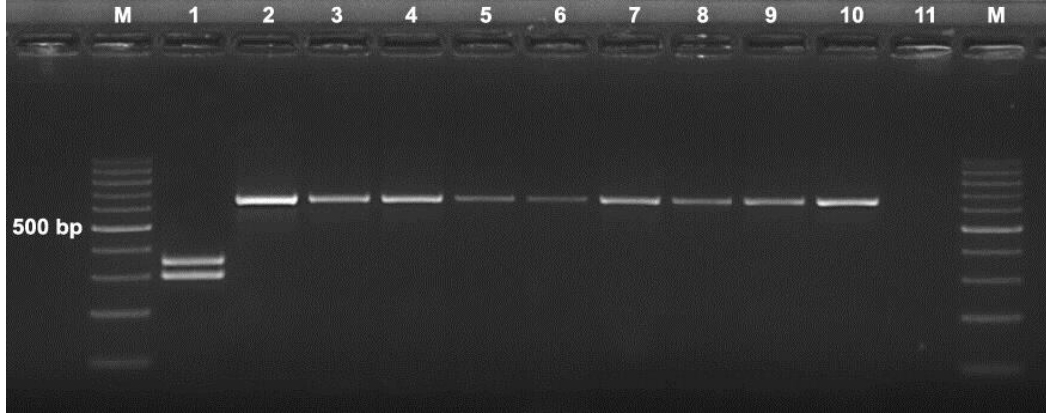
Şekil 7: EC9/ EC12A ve SSAP2f/SSAP2r primerleri ile elde edilen pozitif kontrol ve saha örneklerine ait nested PZR ürünlerinin jel görüntüsü. M, marker (100 bç); N negatif kontrol (N1, distile su; N2, enfekte olmayan sığır genomik DNA’sı). P standart pozitif kontrol (P1, *A. phagocytophilum*; P2, *A. phagocytophilum*-like 1; P3, *A. phagocytophilum*-like 2). 1-7, RLB’de Catchall proba sinyal veren *Anaplasma* spp. pozitif saha örnekleri.

Şekil 7’den görüleceği üzere, gerek standart pozitif kontrol gerekse saha örneklerine ait DNA’lardan beklenildiği gibi 641-642 bç uzunluğunda amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. Bu ürünler restriksiyon enzimleri ile kesilerek restriksiyon bant profilleri belirlenmiştir.

Şekil 7’de SSAP2f/SSAP2r primerleri ile elde edilen pozitif kontrol (*A. phagocytophilum*, *A. phagocytophilum*-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2) ve RLB’de Catchall proba sinyal veren *Anaplasma* spp. saha örneklerine ait PZR ürünleri, *Xcm*I ve *Bsa*I restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir.

*Xcm*I enzmi *A. phagocytophilum*’u keserek 344 ve 297 bç uzunluğunda iki bant profili verirken, *A. phagocytophilum*-like (*A. phagocytophilum*-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2) genotiplerinde kesim yapmamaktadır. *Bsa*I enzimi ise *A. phagocytophilum*-like 2’de kesim yaparak 422 (423) ve 219 bç uzunluğunda bant profilleri oluştururken, *A. phagocytophilum* ve *A. phagocytophilum*-like 1’de kesim yapmamaktadır (28).

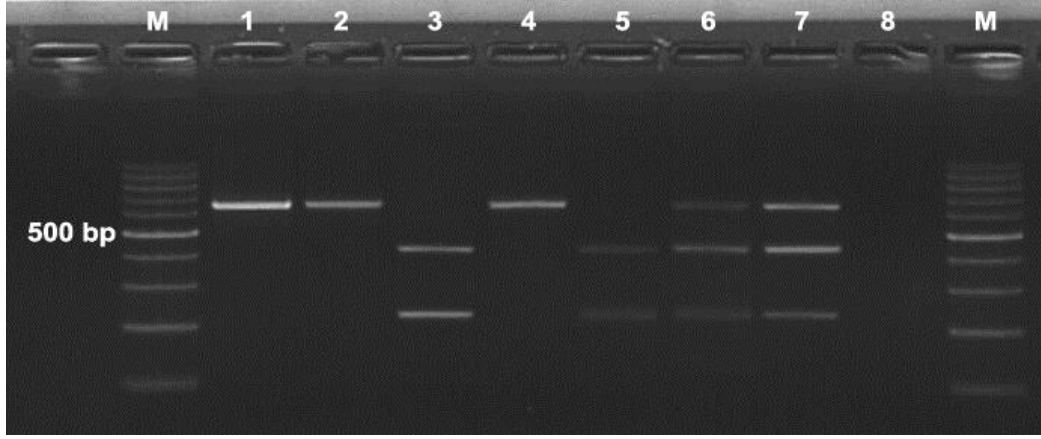
Şekil 7’de elde edilen PZR ürünlerinin *Xcm*I enzimi ile kesildikten sonra oluşan RFLP bant profilleri Şekil 8’de verilmiştir.



Şekil 8: *XcmI* enzimi ile yapılan restriksiyon analizi sonuçları. M, 100 bç marker; 1-3 standart pozitif kontrol (1, *A. phagocytophilum*; 2, *A. phagocytophilum*-like 1; 3, *A. phagocytophilum*-like 2). 4-10, RLB’de Catchall proba sinyal veren *Anaplasma* spp. pozitif saha örnekleri. 11, negatif kontrol.

Şekil 8’den izleneceği gibi, *XcmI* enzimi beklenildiği gibi pozitif kontrol olarak kullanılan *A. phagocytophilum*’da 344 ve 297 bç uzunluğunda iki bant profili verirken (Şekil 8, sıra 1), gerek *A. phagocytophilum*-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2 pozitif kontrollerde (Şekil 8, sıra 2, 3) ve gerekse saha örneklerinde (Şekil 8, sıra 4-11) kesim yapmamıştır. Buradan saha örneklerindeki pozitifliğin *A. phagocytophilum*’dan değil, *A. phagocytophilum*-like genotiplerinden (*A. phagocytophilum*-like 1 veya *A. phagocytophilum*-like 2) kaynaklandığı görülmüştür.

Saha örneklerindeki pozitifliğin hangi genotipten kaynaklandığını belirlemek için aynı PZR ürünleri, *BsaI* enzimi ile kesilmiş ve RFLP sonucunda oluşan bant profilleri Şekil 9’da verilmiştir.



Şekil 9: *BsaI* enzimi ile yapılan restriksiyon analizi sonuçları. M, 100 bç marker; 1-3 standart pozitif kontrol (1, *A. phagocytophilum*; 2, *A. phagocytophilum*-like 1; 3, *A. phagocytophilum*-like 2). 4-7 saha örnekleri [4, *A. phagocytophilum*-like 1; 5 *A. phagocytophilum*-like 2; 6-7 miks enfeksiyon (*A. phagocytophilum*-like 1+ *A. phagocytophilum*-like 2). 8, negatif kontrol.

Şekil 9'dan anlaşılacağı üzere, *BsaI* enzimi beklenildiği gibi *A. phagocytophilum* ve *A. phagocytophilum*-like 1'de kesim yapmazken (Şekil 9, sıra 1 ve 2), *A. phagocytophilum*-like 2'de 422 (423) ve 219 bç uzunluğunda iki bant profili oluşturmuştur (Şekil 9, sıra 3). Aynı enzim, yine beklenildiği gibi her iki genotip ile (*A. phagocytophilum*-like 1 +*A. phagocytophilum*-like 2) miks örneklerde 641 (642), 421 (422) ve 219 bç uzunluğunda 3 farklı bant profili vermiştir (Şekil 9, sıra 6-7).

RFLP analizi sonucunda, RLB'de sadece Catchall proba sinyal veren 11 örnekten 8'inin *A. phagocytophilum*-like 1, 3'ünün ise *A. phagocytophilum*-like 2 ile enfekte olduğu belirlenmiştir. İki örnekte miks enfeksiyon (*A. phagocytophilum*-like 1 +*A. phagocytophilum*-like 2) tespit edilmiştir (Şekil 9, sıra 6-7).

Böylece Malatya yöresinde yapılan bu çalışmada, ilk defa Türkiye’de sığırlarda *A. phagocytophilum*-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2 genotiplerinin varlığı ortaya konmuştur.

5.5. *Anaplasma phagocytophilum*-like genotiplerinin moleküler karakterizasyonu

Gerek RFLP sonuçlarının doğrulanması ve gerekse *A. phagocytophilum*-like genotiplerindeki varyantların belirlenmesi amacıyla, RFLP ile *A. phagocytophilum*-like 1 (n = 8) ve *A. phagocytophilum*-like 2 (n = 3) olarak identifiye edilen örneklerin 16S rRNA geninde 598-599 bp uzunluğundaki bölgenin DNA dizilimi belirlenmiştir. Elde edilen sekansların, MT338494-MT338504 giriş numaraları ile GenBank’a kayıtları yapılmıştır. Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) programı ile çoklu nükleotit hizalamaları sonucunda, *A. phagocytophilum*-like 1 (Aplike1Bv, GenBank giriş no. MT338494-MT338501) ve *A. phagocytophilum*-like 2 (Aplike2Bv, GenBank giriş no. MT338502-MT338504) genotipine ait 2 farklı varyant tespit edilmiştir (Tablo 9). *Anaplasma phagocytophilum*-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2 varyantlar arasında 9 nükleotit farklılığı ile %98.50 oranında benzerlik tespit edilmiştir (Tablo 9, 10).

Bu çalışmada tespit edilen *A. phagocytophilum*-like 1 varyant (Aplike1Bv, GenBank giriş no. MT338494-MT338501) daha önce Tunus’ta ruminantlarda (Aplike1BvCp1, KX702974; Aplike1Ov1, KX702978) ve Japonya’da geyiklerde (Clone 1; JN055357) bildirilen *A. phagocytophilum*-like 1 izolatları ile %99.67-100 oranında benzerlik göstermiştir (Tablo 9, 10).

Yine bu çalışmada tespit edilen *A. phagocytophilum*-like 2 varyantın (Aplike2Bv, GenBank giriş no. -MT338504) daha önce Tunus'ta koyun ve keçiler (Aplike2OvCp1, KX702980; Aplike2Cp1, KX702985) ile Çin'de *Hyalomma asiaticum* (BL099-6, KJ410247) türü kenede bildirilen *A. phagocytophilum*-like 2 izolatlarına %99.33-99.83 oranında benzer olduğu belirlenmiştir (Tablo 9, 10).



Tablo 9: *Anaplasma phagocytophilum*'a benzeyen *A. phagocytophilum*-like genotiplerine ait 16S rRNA sekansları (598–599 bç) arasındaki nükleotit farklılıkları.

Konak	Genetik varyant ^a	Ülke	GenBank	16S rRNA nükleotit pozisyon ^b														Kaynak
				823	830	1011	1109	1111	1113	1120	1137	1148	1237	1239	1240	1260	1291	
İnsan	Webster	ABD	NR_044762	T	T	A	G	T	A	C	A	T	T	T	C	G	C	95
At	Camawi	ABD	AF172167	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Unpublished
Köpek	Dog2	ABD	CP006618	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Unpublished
Geyik	Clone 1	Japonya	JN055357	C	*	*	*	A	-	*	G	C	*	*	*	*	*	23
Sığır ve keçi	Aplike1BvCp1	Tunus	KX702974	C	*	*	*	A	-	*	G	C	*	*	*	*	*	28
Koyun	Aplike1Ov1	Tunus	KX702978	C	*	*	*	A	T	*	G	*	*	*	*	*	*	28
Sığır	Aplike1Bv	Türkiye	MT338494	C	*	*	*	A	T	*	G	*	*	*	*	*	*	Bu çalışma
Sığır	Aplike2Bv	Türkiye	MT338502	C	A	G	A	A	T	T	G	C	C	C	*	A	T	Bu çalışma
Koyun ve keçi	Aplike2OvCp1	Tunus	KX702980	C	A	G	*	A	T	T	G	C	C	C	T	A	T	28
Keçi	Aplike2Cp1	Tunus	KX702985	C	A	G	*	A	T	T	G	C	C	C	T	*	T	28
Kene ^c	BL099-6	Çin	KJ410247	*	A	G	*	A	T	T	G	C	C	C	T	A	T	25

Kısaltmalar: Nükleotitler: C, Sitozin; T, Timin; G, Guanin; A, Adenin. * Yıldızlar korunmuş nükleotitleri göstermektedir.

^aAplike1Bv (*Anaplasma phagocytophilum*-like 1) varyant bu çalışmada elde edilen MT338494-MT338501 giriş numaralı sekansları; Aplike2Bv ise MT338502-MT338504 giriş numaralı sekansları temsil etmektedir.



Sayılar, *A. phagocytophilum* HZ USA izolatının (GenBank accession number NC 007797) (96) nükleotit pozisyonuna göre belirlenmiştir. 1011 ve 1137 nükleotitlerdeki Adenin (A) Guanin (G) değişikliği, *A. phagocytophilum* ve *A. phagocytophilum*-like genotiplerinin ayırımına izin vermektedir. 1011 deki Adenin (A) Guanin (G) değişikliğinde *BsaI* enzimi *A. phagocytophilum* ve *A. phagocytophilum*-like 1’de kesim yapmamakta, ancak *A. phagocytophilum*-like 2 genotipini keserek 422 (or 423) ve 219 bp uzunluğunda iki bant profili vermektedir. 1137 deki Adenin (A) Guanin (G) değişikliğinde ise *XcmI* enzimi *A. phagocytophilum*’u keserek 344 and 297 bp uzunluğunda iki bant profili oluştururken, *A. phagocytophilum*-like genotiplerinde (*A. phagocytophilum*-like 1 ve 2) kesim yapmamaktadır (28).

^c *Hyalomma asiaticum*

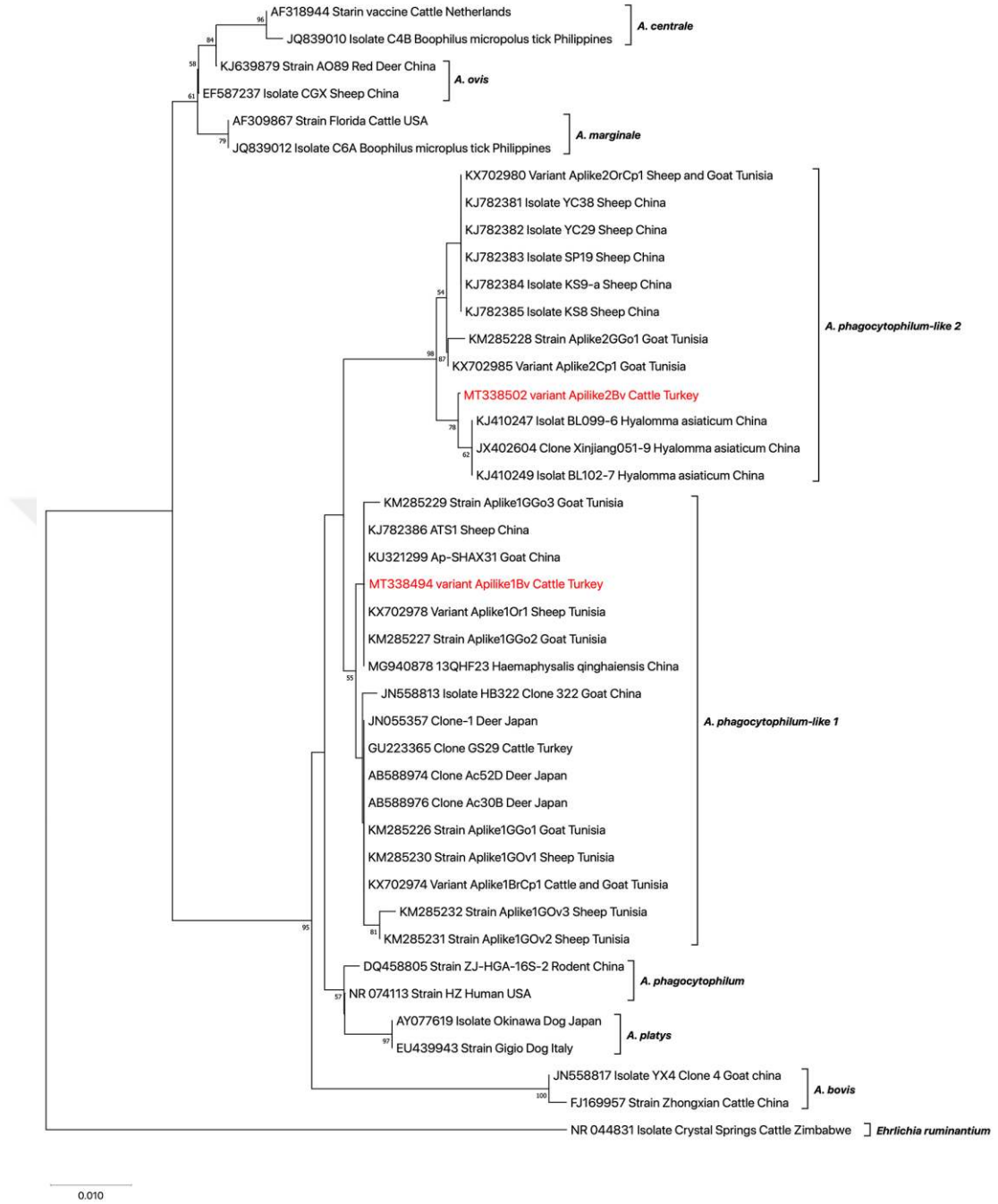
Tablo 10: Bu çalışmada sığırlarda tespit edilen *Anaplasma phagocytophilum*-like 1 and 2 genotipleri ile GenBank'ta kayıtlı diğer izolatlar arasındaki yüzde benzerlik analizi.

Genotip	Konak veya vektör	Genetik varyant	Ülke	GenBank giriş no.		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>A. phagocytophilum</i> -like 2	<i>H. asiaticum</i>	BL099-6	Çin	KJ410247	1	100.00	99.50	99.83	99.33	97.32	98.33	98.33	98.33
<i>A. phagocytophilum</i> -like 2	Koyun ve keçi	Aplike2OvCp1	Tunus	KX702980	2		100.00	99.67	99.83	98.49	98.49	98.50	98.50
<i>A. phagocytophilum</i> -like 2	Sığır	Aplike2Bv	Türkiye	MT338502	3			100.00	99.50	98.49	98.49	98.50	98.50
<i>A. phagocytophilum</i> -like 2	Keçi	Aplike2Cp1	Tunus	KX702985	4				100.00	98.66	98.66	98.66	98.66
<i>A. phagocytophilum</i> -like 1	Geyik	Clone 1	Japonya	JN055357	5					100.00	100.00	99.67	99.67
<i>A. phagocytophilum</i> -like 1	Sığır ve keçi	Aplike1BvCp1	Tunus	KX702974	6						100.00	99.67	99.67
<i>A. phagocytophilum</i> -like 1	Koyun	Aplike1Ov1	Tunus	KX702978	7							100.00	100.00
<i>A. phagocytophilum</i> -like 1	Sığır	Aplike1Bv	Türkiye	MT338494	8								100.00

5.6. Filogenetik analiz

Bu çalışmada elde edilen *A. phagocytophilum*-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2 varyantlarının, GenBank veri tabanında kayıtlı diğerk *Anaplasma* spp. izolatlarını temsilen seçilen sekansların oluşturduğu filogenetik ağaç içerisindeki yeri şekil 10’da verilmiştir.





Şekil 10: Maksimum Likelihood yöntemi kullanılarak *Anaplasma* türlerinin 16S rRNA gen dizilerine dayanan filogenetik ağaç. Düğümlerdeki sayılar 1000 replikat ile bootstrap değerlerini temsil etmektedir (sadece % 50'den daha büyük değerler alınmıştır). Sekanslar GenBank erişim numarası, suş veya izolat adı, konakçı veya vektör ve ülke olarak verilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sekanslar

kırmızı olarak belirtilmiştir. Ölçek çubuğu, nükleotit pozisyonu başına 0.01 ikameyi temsil etmektedir. Dış grup olarak *Ehrlichia ruminantium* (GenBank giriş numarası: NR_044831) kullanılmıştır.

Şekil 10'dan anlaşılacağı gibi, bu çalışmada tespit edilen *A. phagocytophilum*-like 1 ve 2 varyantlarının, *A. phagocytophilum* ile yakından ilişkili olduğu, ancak daha önce farklı bölgelerde ruminantlarda ve kenelerde identifiye edilen *A. phagocytophilum*-like 1 ve 2 izolatları ile birlikte iki farklı grupta bağımsız olarak kümelendiği görülmüştür.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Anaplasma soyuna bağlı türler, Türkiye'nin de içinde bulunduğu tropikal ve subtropikal iklim kuşağında yer alan bölgelerde hayvanlarda klinik ve subklinik enfeksiyonlara neden olurlar. Sığırlarda anaplazmoza neden olan 4 (*A. marginale*, *A. phagocytophilum*, *A. centrale* ve *A. bovis*) tür tanımlanmıştır (7, 10, 11). Bunlardan *A. phagocytophilum* sığırların yanı sıra diğer birçok memeli hayvan ile birlikte insanlarda da enfeksiyona neden olmaktadır (10). Son yıllarda önce Japonya'da sığır, geyik ve bazı ixodid kenelerde (19-22), daha sonra Çin'de koyun, keçi ve *Hyalomma asiaticum*'da (25) *Anaplasma phagocytophilum* ile yakından ilişkili yeni *Anaplasma* spp. strainleri bildirilmiştir. Filogenetik analizlerde, Japonya ve Çin'de bildirilen bu strainlerin hem *A. phagocytophilum*'dan hemde birbirlerinden farklı iki ayrı grupta kümelendiği ve dolayısı ile bunların ayrı türler olabileceği rapor edilmiştir (23, 24). Tunus'ta 2015 yılında Ben Said ve ark. (27) tarafından yapılan çalışmada, *Anaplasma* pozitif keçi örneklerinden elde edilen sekansların Japonya ve Çin'de bildirilen strainlere benzer olduğunu ortaya koymuştur. Ben Said ve ark. (28), Japonya ve Çinde bildirilen strainlerin hem *A. phagocytophilum*'dan hem de birbirlerinden ayırımına imkan veren RFLP yöntemi geliştirmiş ve bu genotipleri *A. phagocytophilum*-like 1 (Japanese strains) ve *A. phagocytophilum*-like 2 (Chinese strains) olarak adlandırmışlardır (28). RFLP yöntemi Tunus'ta *A. phagocytophilum*-like genotiplerinin varlığı ve yaygınlığının belirlenmesinde kullanılmış ve sığır, koyun, keçi ve *Rhipicephalus turanicus*'ta her iki genotipin (*A. phagocytophilum*-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2) mevcut olduğu bildirilmiştir (28).

Anaplasma phagocytophilum-like 1 (Japanese strains) genotipinden kaynaklı enfeksiyonlar İtalya'da koyun ve keçilerde de rapor edilmiştir (29).

RLB yönteminde, Catchall ve soy spesifik problar ile reaksiyon veren, ancak membrana bağlanmış tür spesifik problar ile sinyal oluşturmeyen amplikonların, yeni bir türün, alt türün yada farklı bir genotipin varlığını işaret edebileceği belirtilmiştir (7, 91, 97, 98). Bu çalışmada, RLB membranına *Anaplasma/Ehrlichia* Catchall ve 5 tür spesifik prob bağlanmıştır (Tablo 4). EC9/EC12A ve 16S8FE/B-GA1B primerleri ile sığır örneklerinden elde edilen amplikonların büyük bir kısmı, *A. marginale*, *A. centrale* ve *Anaplasma* sp. Omatjanne spesifik prob karşılıkları ile sinyal verirken, 11 örnekte sadece *Anaplasma/Ehrlichia* Catchall probuna sinyal alınmıştır (Şekil 6). Bunları temsilen seçilen bir örneğin DNA dizilimi belirlenerek (GenBank giriş no. MT338494) BLAST analizi yapıldığında, GenBank veri tabanında *A. phagocytophilum* ve uncultured *Anaplasma* sp. olarak yayınlanan izolatlarla %99.33-100 oranında benzerlik göstermiştir. *Anaplasma phagocytophilum*'un vektörü, Kuzey yarım kürede *Ixodes persulcatus*, ülkemizde içinde yer aldığı Avrupa'da ise *Ixodes ricinus*'tur (10, 54). Farklı iklim, bitki ve coğrafik özelliklere sahip Türkiye'de, bölgeler arasında ixodid kene popülasyonunda önemli farklılıklar görülebilmektedir. Bu çalışmanın yürütüldüğü Malatya ili, karasal iklim özelliğine sahip olup, bu bölgede sığırlarda baskın kene türünün *Hyalomma* spp. (99, 100), Karadeniz bölgesinin kıyı kesimi gibi daha nemli ve yağışlı bölgelerde ise *I. ricinus* olduğu bilinmektedir (101, 102). Buna göre Malatya yöresinde sığırlarda Catchall proba sinyal alınan örneklerde, *A. phagocytophilum* olma ihtimalinin çok düşük olacağı değerlendirilmiştir.

Bu durum, bölgedeki sığırların yeni bir *Anaplasma* türü ya da genotipi ile enfekte olabileceğini, bu enfeksiyonun da son yıllarda tanımlanan *A. phagocytophylum*-like genotiplerinden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Dolayısı ile bu çalışmada Catchall proba sinyal veren örnekler, Ben Said ve ark. (28) bildirdiği şekilde PZR-RFLP yöntemi ile incelenmiştir. RFLP sonucunda 11 örnekten 8'inin *A. phagocytophylum*-like 1 (Şekil 8), 3'ünün ise *A. phagocytophylum*-like 2 ile enfekte olduğu belirlenmiştir (Şekil 9).

Bu çalışmada, sığırlarda tespit edilen *A. phagocytophilum*-like genotiplerindeki genetik varyantların moleküler tiplendirmesi ve filogenetik ağaçtaki yeri belirlenmiştir. *Anaplasma phagocytophilum*-like 1 sekanslarındaki varyant (Aplile1Bv), Tunus'ta ruminantlarda (28) ve Japonya'da geyiklerde (23) bildirilen *A. phagocytophilum*-like 1 izolatları ile %99.67-100 benzerlik göstermiştir. *Anaplasma phagocytophilum*-like 2 varyant ise (Aplike2Bv) yine Tunus'ta koyun ve keçiler (28) ile Çin'de *Hyalomma asiaticum* (25) türü kenede bildirilen *A. phagocytophilum*-like 2 izolatlarına %99.33-99.83 benzerlik göstermiştir (Tablo 9, 10).

Bu çalışmada identifiye edilen *A. phagocytophilum*-like 1 (Aplile1Bv) *A. phagocytophilum*-like 2 (Aplile2Bv) varyantları, filogenetik ağaçta *A. phagocytophilum*'un oluşturduğu küme yerine, daha önce farklı bölgelerde ruminantlarda ve kenelerde identifiye edilen *A. phagocytophilum*-like 1 ve 2 izolatları ile birlikte iki farklı grupta bağımsız olarak kümelendiği görülmüştür (Şekil 10).

Klinik vakalarda *Anaplasma* türlerinin teşhisinde, kan hücreleri içindeki etkenlerin morfolojik yapılarına bakılmıştır. Ancak subklinik enfekte bireylerde

bu patojenlerin mikroskopik teşhisi zordur. PZR ve PZR tabanlı moleküler yöntemlerle, *Anaplasma* türlerinin ayırıcı teşhisi kolaylıkla yapılabilir. Bu yöntemlerden RLB, hem yüksek duyarlılığa sahip olması, hem de aynı anda konak kanında olabilecek birden fazla türü belirleyebilmesi açısından son yıllarda ülkemizde de tercih edilen bir yöntem olmuştur (7, 11, 103). Bu çalışmada, sığırlardan toplanan kan örneklerinde *Anaplasma* türlerinin varlığı ve yaygınlığının belirlenmesinde PZR tabanlı RLB ve RFLP yöntemleri kullanılmıştır. Buna göre Malatya yöresinde sığırlarda *A. marginale*, *A. centrale*, *Anaplasma* sp. Omatjanne, *A. phagocytophilum*-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2'den kaynaklı tek ya da miks enfeksiyonların varlığı ortaya konmuştur. Bu türlerden *A. marginale*, *A. centrale* ve *Anaplasma* sp. Omatjanne'nin varlığı daha önce ülkemizde sığırlarda yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (11, 47-52, 103). Ancak *A. phagocytophilum*'a yakın benzerlik gösteren ve yeni tanımlanan *A. phagocytophilum*-like (*A. phagocytophilum*-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2) genotipleri Türkiye'de ilk defa bu çalışmada tespit edilmiştir.

Türkiye'de sığırlarda anaplazmozun epidemiyolojisi ile ilgili yapılan çalışmalarda uzun yıllar mikroskopik ve serolojik yöntemler kullanılmıştır. Bu çalışmalara bakıldığında ülkemizin farklı bölgelerinde hastalığın %61'e varan oranda yaygın olduğu görülmektedir (44-51). İki aşamalı PZR yöntemi ile Adana'da 187 sığırdan yapılan moleküler çalışmada, *A. marginale* ve *A. centrale*'nin moleküler prevalansı sırası ile %3,2 ve %1,6 olarak tespit edilmiştir (52). Aynı yöntemle Trakya bölgesinde 184 sığır *A. marginale* yönünden test edilmiş ve %31 oranında pozitiflik saptanmıştır (7). RLB yöntemi ile Karadeniz bölgesinde yapılan başka bir araştırmada, muayene edilen 123 sığırdan

%45,1'inin beş *Anaplasma* türünden (*A. phagocytophilum*, %30,8; *A. marginale*, %18,8; *A. centrale*, %18; *Ehrlichia* sp. strain Omatjenne, %13,5; *A. bovis*, %0,7) en az biriyle enfekte olduğu bildirilmiştir (11).

Bu çalışmada, Malatya yöresinde muayene edilen 200 sığırın 77 (%38,5)'sinde *A. marginale*, *A. centrale*, *Anaplasma* sp. Omatjenne ve *A. phagocytophilum*-like (*A. phagocytophilum*-like 1, *A. phagocytophilum*-like 2) genotiplerinden kaynaklanan tek ve miks enfeksiyonlar tespit edilmiştir. Gerek Malatya yöresinde yapılan bu çalışmada ve gerekse ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan yukarıdaki çalışmalarda elde edilen sonuçlar, farklı coğrafik yapı ve iklime sahip bölgelerde sığırlarda *Anaplasma* türlerinin dağılımı ve prevalansında değişkenlik olmakla beraber, Türkiye'nin hemen her bölgesinde yaygın olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak;

- Malatya iline bağlı üç ilçede yapılan bu sürveyde, sığırlarda *Anaplasma* soyuna bağlı *A. marginale*, *A. centrale*, *Anaplasma* sp. Omatjenne, *A. phagocytophilum*-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2 tür ve genotiplerinden kaynaklı enfeksiyonların varlığı ortaya konmuştur.
- Bölgede sığırlarda *A. marginale*'nin en yaygın tür olduğu ve bu türden kaynaklı klinik enfeksiyonların görülebileceği beklenmelidir.
- Ülkemizde sığırlarda daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilen *A. phagocytophilum* ve *A. bovis* türlerine bu çalışmada rastlanmamıştır. Ancak, *A. phagocytophilum*'a yakın benzerlik gösteren *A. phagocytophilum*-like 1 ve *A. phagocytophilum*-like 2 genotipleri ülkemizde ilk defa bu çalışmada tanımlanmıştır.

- Aynı zamanda zoonoz olan *A. phagocytophilum* sığırlarda klinik enfeksiyona neden olan bir *Anaplasma* türüdür. Bu bakteri ülkemizde içinde bulunduğu Avrupa bölgesinde *I. Ricinus* ile nakledilmektedir. *Ixodes ricinus*, ülkemizde nemli ve yağışlı bölgelerde baskın kene türü olup, Malatya gibi karasal iklime sahip bölgelerde bu türe rastlanmamaktadır. *Anaplasma phagocytophilum*'a yakın benzerlik gösteren *A. phagocytophilum*-like 1 ve 2 genotiplerinin vektörleri bilinmemektedir. Bu genotiplerin *I. ricinus* dışında diğer ixodid kenelerle nakledilme ihtimali oldukça yüksektir. Bu durumun, ileride yapılacak detaylı çalışmalarla ortaya konması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. İnci A, Düzlü Ö. Vektörler ve Vektörlerle Bulaşan Hastalıklar. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2009; 6 (1): 53-63.
2. İnci A, Yazar S, Tuncbilek AS, et al. Vectors and Vector-Borne Diseases in Turkey. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2013; 60: 281-296.
3. İnci A, Yıldırım A, Düzlü Ö, Doğanay M, Aksoy S. Tick-borne diseases in Turkey: a review based on One Health Perspective, Plos Neglected Tropical Diseases 2016; 15: 1-12.
4. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2001; 51(6): 2145-2165.
5. Abdisa T. Epidemiology of bovine anaplasmosis. SOJ Vet Sci 2019; 5 (1): 1-6.
6. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet Parasitol 2010; 167: 95-107.
7. Aktas M, Özübek S. Outbreak of anaplasmosis associated with novel genetic variants of *Anaplasma marginale* in a dairy cattle. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2017; 54: 20-26.
8. Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmone AA, Melendez RD. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. Clin Microbiol Rev 2003; 16(4): 698-712.
9. Rymaszewska A, Grenda S. Bacteria of the genus *Anaplasma*-characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. Vet Med 2008; 53: 573-584.
10. Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Parasitol 2010; 167: 108-122.
11. Aktas M, Özübek S. Bovine anaplasmosis in Turkey: First laboratory confirmed clinical cases caused by *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Microbiol 2015; 78: 246-251.
12. Rar V, Golovljova I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and ‘‘*Candidatus Neoehrlichia*’’ bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. Infection, Genetics and Evolution 2011; 11: 1842-1862.
13. Pipano E, Krigel Y, Frank M, Markovics A, Mayer E. Frozen *Anaplasma centrale* Vaccine Against Anaplasmosis in Cattle, British Veterinary Journal 1986; 142: 553-556.

14. Sakamoto L, Ichikawa Y, Sakata Y, Matsumoto K, Inokuma H. Detection of *Anaplasma bovis* DNA in the peripheral blood of domestic dogs in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2010; 63: 349-352.
15. Sasaki H, Ichikawa Y, Sakata Y, et al. Molecular survey of *Rickettsia*, *Ehrlichia*, and *Anaplasma* infection of domestic cats in Japan. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2012; 3: 308-311.
16. Masuzawa T, Uchishima Y, Fukui T, et al. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma bovis* in small wild mammals from Taichung and Kinmen Island, Taiwan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2014; 67: 111-114.
17. Harrison A, Bastos ADS, Medger K, Bennett NC. Eastern rock sengis as reservoir hosts of *Anaplasma bovis* in South Africa. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2013; 4: 503-505.
18. Woldehiwet Z. *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078: 446-460.
19. Ohashi N, Inayoshi M, Kitamura K, et al. *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1780–1783.
20. Kawahara M, Rikihisa Y, Lin Q, et al. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 1102–1109.
21. Jilintai, Seino N, Hayakawa D, et al. Molecular survey for *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* infection in cattle in a pastureland where sika deer appear in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62: 73–75.
22. Yoshimoto K, Matsuyama Y, Matsuda H, et al. Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* DNA from *Haemaphysalis megaspinosus* in Hokkaido, Japan. *Vet Parasitol* 2010; 168: 170–172.
23. Ybáñez AP, Matsumoto K, Kishimoto T, Inokuma H. Molecular analyses of a potentially novel *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* detected in sika deer (*Cervus nippon yessoensis*) in Japan. *Vet Microbiol* 2012; 157: 232–236.
24. Ybáñez AP, Tagawa M, Matsumoto K, et al. Specific molecular detection of *Anaplasma* sp. closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in ixodid ticks and cattle in a pastureland in Hokkaido, Japan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013; 13: 6-11.
25. Kang YJ, Diao XN, Zhao GY, et al. Extensive diversity of Rickettsiales bacteria in two species of ticks from China and the evolution of the Rickettsiales. *BMC Evol Biol* 2014; 14: 167.
26. Yang J, Li Y, Liu Z, et al. Molecular detection and characterization of *Anaplasma* spp. in sheep and cattle from Xinjiang, northwest China. *Parasit Vectors* 2015; 19: 108.

27. Ben Said M, Belkahia H, Alberti A, et al. Molecular survey of *Anaplasma* species in small ruminants reveals the presence of novel strains closely related to *A. phagocytophilum* in Tunisia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2015; 15: 580-590.
28. Ben Said M, Belkahia H, El Mabrouk N, et al. Molecular typing and diagnosis of *Anaplasma* spp. closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants from Tunisia. *Ticks Tick Borne Dis* 2017; 8: 412–422.
29. Zobba R, Ben Said M, Belkahia H, et al. Molecular epidemiology of *Anaplasma* spp. related to *A. phagocytophilum* in Mediterranean small ruminants. *Acta Tropica* 2020; 202: 105286
30. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology* 2004; 129: 285-300.
31. Scoles GA, Broce AB, Lysyk TJ, Palmer GH. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol* 2005; 42: 668–675.
32. Munderloh UG, Lynch MJ, Herron MJ, et al. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet Microbiol* 2004; 101: 53–64.
33. Ristic M. Bovine anaplasmosis. In: Kreier J. (Editor). *Parasitic Protozoa*, vol. 4. Academic Press, New York 1977: 235–249.
34. Rodriguez SD, Ortiz MAG, Ocampo RJ, Vega CA. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. *Infect Genet Evol* 2009; 9(6): 1092–1101.
35. Shkap V, Kocan K, Molad T, et al. Experimental transmission of field *Anaplasma marginale* and the *A. centrale* vaccine strain by *Hyalomma excavatum*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* ticks. *Vet Microbiol* 2009; 134: 254–260.
36. Kocan KM, Goff WL, Stiller D, et al. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible cattle. *J Med Entomol* 1992a; 29: 657–668.
37. Kocan KM, Stiller D, Goff WL, et al. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from infected to susceptible cattle. *Am J Vet Res* 1992b; 5: 499–507.

38. Samish M, Pipano E, Hadani A. Intrastadial and interstadial transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus annulatus* ticks in cattle. Am J Vet Res 1993; 54: 411–414.
39. Rey Valeiron C, Aso PM, Coronado A. Prevalence of *Anaplasma marginale* and specific antibodies in new born calves. Acta Cient Venez 2003; 54 (2): 121-126.
40. Jonsson NN, Reid SWJ. Global climate changes and vector borne diseases. The Veterinary Journal 2000; 160: 87–89
41. Sheesley DJ, Greifer JK. Implications of international trade agreements for global animal health. Annals of the New York Academy of Sciences. 1996; 791(1): 296–302.
42. Tuzer E. İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda görülen *Babesia*, *Theileria* ve *Anaplasma* türleri ve bunlardan oluşan enfeksiyonların yayılışı üzerinde araştırma. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1982.
43. Karagenç T, Bilgiç HB, Hosgör M, ve ark. XIV. Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı. Aydın Yöresi Sığırlarında RLB Tekniği Kullanılarak *Theileria*, *Babesia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia* Türlerinin Belirlenmesi. İzmir: 2005: 262-263.
44. Sevinç F, Derinbay Ö. XIV. Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı. Bir Sığırcılık İşletmesinde Anaplasmosis Problemi. İzmir: 2005: 133-134.
45. Sevinç F. Sığırlarda Anaplasmosis. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2004; 1(2): 113-118.
46. Birdane FM, Sevinc F, Derinbay Ö. *Anaplasma marginale* Infections in Dairy Cattle: Clinical Disease With High Seroprevalence. Bull Vet Inst Pulawy 2006; 50: 467-470.
47. Gökçe G, Kırmızıgül AH, Yıldırım Y, Erkiş EE. Kars Yöresindeki Sığırlarda *Anaplasma marginale* Seroprevalansı. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 19 (Suppl-A) 2013; 187-190.
48. Selçuk Ö, Alver O, Çatık S, Aydın L, Şenlik B. Determination of Diagnostic Value of cELISA For The Diagnosis of Anaplasmosis in Clinically Suspected Ruminants. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2015;21 (5): 691-695.
49. Açııcı M, Bölükbaş CS, Pekmezci GZ, ve ark. Seroepidemiological Survey of Bovine Tick-Borne Infections in The Black Sea Region of Turkey. Turk J Vet Anim Sci 2016; 40: 170-174.
50. Oğuz B, Özdal N, Kılınç Ö, ve ark. Van, Muş, Siirt ve Diyarbakır İllerinde Sığırlarda Anaplasmosis'in Seroprevalansı. Kocatepe Vet J 2018; 11 (3): 208-214.
51. Isik N, Derinbay Ö, Sevinc F. The endemic status of *Anaplasma marginale* in cattle, in Turkey. Indian Journal of Animal Research 2018; 52 (5): 750-753.

52. Gökmen TG, Günaydın E, Sezer O, Demir PA, Ütük AE. Investigation of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in Cattle in Adana Province by Serological and Molecular Methods. Etlik Vet Mikrobiyol Derg 2019; 30 (2): 109-114.
53. Gokce HI, Genc O, Akca A, et al. Molecular and serological evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection farm animals in the Black Sea Region of Turkey. Acta Vet Hung 2008; 56(3): 281-292.
54. Aktas M, Vatansever Z, Altay K, Aydin MF, Dumanli N. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from Turkey. Trans R Soc Trop Med Hyg 2010; 104(1): 10-15.
55. Aubry P, Geale DW. A Review of Bovine Anaplasmosis. Transboundary and Emerging Diseases 2011; 58: 1–30.
56. Richey EJ, Palmer GH. Bovine anaplasmosis. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian 1990; 12(11): 1661–1668.
57. Palmer, GH, Rurangirwa FR, Kocan KM, Brown WC. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. Parasitol 1999; 15: 281–286.
58. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. Veterinary Medicine. 2007; 10: 2045-2050
59. Kieser ST, Eriks IE, Palmer GH. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection in cattle. Infect Immun 1990; 58: 1117–1119.
60. Stuen S. *Anaplasma phagocytophilum* (formerly Ehrlichia phagocytophila) infection in sheep and wild ruminants in Norway. A study on clinical manifestation, distribution and persistence: Doctor Philosophiae Thesis, Norwegian College of Veterinary Medicine. 2003.
61. Gray D, Webster K, Berry JE. Evidence of louping ill and tickborne fever in goats. Veterinary Record 1988; 122(3)
62. Woldehiwet Z. The effects of tick-borne fever on some functions of polymorphonuclear cells of sheep. J Comp Pathol 1987; 97: 481–485.
63. Smith RD, Hungerford LL, Armstrong CT. Epidemiologic investigation and control of an epizootic of anaplasmosis in cattle in winter. JAVMA 1989; 195: 476–480.
64. Knowles D, Torioni de Echaide S, Palmer GH, et al. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identified persistently infected cattle. J Clin Microbiol 1996; 34: 2225-2230.

65. Dreher UM, Hofmann-Lehmann R, Meli ML, et al. Seroprevalence of anaplasmosis among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: no evidence of an emerging disease. *Vet Microbiol* 2005; 107: 71-79.
66. Gale KR, Dimmock CM, Gartside M, Leatch G. *Anaplasma marginale*: detection of carrier cattle by PCR-ELISA. *Int J Parasitol* 1996; 26: 1103-1109.
67. Carelli G, Decaro N, Lorusso A, et al. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Vet Microbiol* 2007; 124: 107-114.
68. Rijpkema, SG, Molkenboer MJ, Schouls LM, Jongejan F, Schellekens JF. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1995; 33(12): 3091- 3095.
69. Georges K, Loria GR, Riili S, et al. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet Parasitol* 2001; 99 (4): 273-286.
70. Altay K, Dumanli N, Aktas M. Molecular identification, genetic diversity and distribution of *Theileria* and *Babesia* species infecting small ruminants. *Vet Parasitol* 2007; 147: 161-165.
71. Altay K, Aktas M, Dumanli N. Detection of *Babesia ovis* by PCR in *Rhipicephalus bursa* collected from naturally infested sheep and goats. *Res Vet Sci* 2008; 85(1): 116-119.
72. Richey EJ. Bovine anaplasmosis. In: Howard RS. (Editör). *Current Veterinary Therapy Food Animal Practice*, Philadelphia: Saunders 1981; 767-772.
73. Potgieter FT, Stoltz WH. Anaplasmosis. In: Coetzer JAW, Thompson GR, Tustin RC. (Editors). *Infectious Diseases of Livestock- With Special Reference to Southern Africa*. Oxford University Press, 1994.
74. McHardy N, Simpson RM. Imidocarb dipropionate therapy in Kenyan anaplasmosis and babesiosis. *Trop Anim Health Prod* 1974; 6: 63-70.
75. Bayley AJ. (Publisher) *Compendium of Veterinary Products*, eighth edition. North American Compendiums INC, Port Huron, MI 2005.
76. Magonigle RA, Newby TJ. Elimination of naturally acquired chronic *Anaplasma marginale* infections with a long-acting oxytetracycline injectable. *Am J Vet Res* 1982; 43: 2170-2172.
77. Özlem MB, Karaer Z, Turgut K, et al. Efficacy of long-acting oxytetracycline on bovine anaplasmosis. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1988; 35: 1-5.

78. Sweet VH, Stauber EH. Anaplasmosis: a regional serologic survey and oral antibiotic therapy in infected herds. J Am Vet Med Assoc 1978; 172: 1310-1312.
79. Woldehiwet Z, Scott GR. Tick-borne (pasture) fever. In: Woldehiwet Z, Ristic M. (Editors). Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals. Pergamon Press, Oxford, 1993; 233-254.
80. Blondeau JM. Fluoroquinolones, mechanism of action, classification and development of resistance. Survey Ophthalmol 2004; 49: 73-78.
81. Guglielmone AA, Anziani OS, Mangold AJ, Volpogni MM, Vogel A. Enrofloxacin to Control *Anaplasma marginale* Infections. Ann NY Acad Sci 1996; 791: 471-472.
82. Coetzee JF, Apley MD. Efficacy of enrofloxacin against severe experimental *Anaplasma marginale* infections in splenectomized calves. Vet Ther 2006; 7: 319-328.
83. Potgieter FT, Stoltz WH. Bovine anaplasmosis. In: Coetzer JAW, Tustin RC. (Editors). Infectious Diseases of Livestock, 2nd Edition, Oxford University Press, Southern Africa, Cape Town 2004; 1: 594-616.
84. Theiler A. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle, In 1st Report of the Director of Veterinary Research, Department of Agriculture of the Union of South Africa. 1911; 7-46.
85. Abdala AA, Pipano E, Aguirre DH, et al. Frozen and fresh *Anaplasma centrale* vaccines in the protection of cattle against *Anaplasma marginale* infection. Rev Elev Med Vet Pays Trop 1990; 43: 155-158.
86. Wright IG. Immunodiagnosis and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp. and *Anaplasma* sp. in domestic animals. Rev Sci Tech Off Int Epizoot 1990; 9: 345-356.
87. Shkap V, Pipano E, McGuire TC, Palmer GH. Identification of immunodominant polypeptides common between *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. Vet Immunol Immunopathol 1991; 29: 31-40.
88. Brock WE, Kliewer IO, Pearson CC. A vaccine for anaplasmosis. J Am Vet Med Assoc 1965; 147: 948-951.
89. <http://www.cografya.gen.tr/05.03.2020>.
90. Schouls LM, Van de Pol I, Rijpkema SG, et al. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. J Clin Microbiol 1999; 37(7): 2215-2222.
91. Bekker CP, de Vos S, Taoufik A, Sparagano OA, Jongejan F. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization Vet Microbiol 2002; 89(2-3): 223-238.
92. Edgar RC. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC Bioinformatics 2004; 5(1): 113.

93. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 2018; 35: 1547-1549.
94. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 2008; 25(7): 1253–1256.
95. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 589-595.
96. Lin M, Kikuchi T, Brewer HM, Norbeck AD, Rikihisa Y. Global proteomic analysis of two tick-borne emerging zoonotic agents: *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*. *Front Microbiol* 2011; 2: 24.
97. Gubbels JM, de Vos AP, van der Weide M, et al. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1782-1789.
98. Schnittger L, Yin H, Qi B, et al. Simultaneously detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasite infecting small ruminants by reverse line blotting. *Parasitol Res* 2004; 92: 189-196.
99. Aktas M, Dumanli N, Angin M. Cattle infestation by *Hyalomma* ticks and prevalence of *Theileria* in *Hyalomma* species in the east of Turkey. *Vet Parasitol* 2004; 119: 1-8.
100. Aktas M, Altay K, Dumanli N. A molecular survey of bovine *Theileria* parasites among apparently healthy cattle and with a note on the distribution of ticks in eastern Turkey. *Vet Parasitol* 2006; 138(3-4): 179-185.
101. Aydın L, Bakırcı S. Geographical distribution of ticks in Turkey. *Parasitol Res* 2007; 101 (2): 163-166.
102. Aktas M, Altay K, Ozubek S, Dumanli N. A Survey of ixodid ticks feeding on cattle and prevalence of tick-borne pathogens in the Black Sea Region of Turkey. *Veterinary Parasitology* 2012; 187 (3-4): 567-571.
103. Aktas M, Altay K, Dumanli N. 2011. Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2011; 2: 62-65.

8. ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Hatay'ın İskenderun ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi İskenderun'da tamamladım. 2001 yılında başladığım Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2006 yılında mezun oldum. 2009-2010 yıllarında Mersin Bozyazı İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğünde ve 2011-2012 yıllarında Malatya Arguvan İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğünde çalıştıktan sonra 2013 yılından bu yana halen çalışmakta olduğum Malatya Yazıhan İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğünde Veteriner Hekim olarak görev yapmaktayım.