

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



**Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman
İllerinde Koyun ve Keçilerde *Theileria* ve
Babesia Türlerinin Araştırılması**

DOKTORA TEZİ

Sezayi ÖZÜBEK

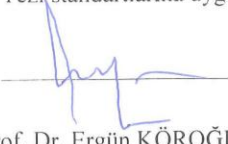
2016

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU

Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Münir AKTAŞ



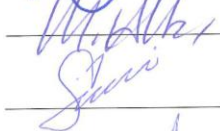
Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Nazir DUMANLI



Prof. Dr. Münir AKTAŞ



Prof. Dr. Abdullah İNCİ



Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

Doç. Dr. Şükrü TONBAK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca maddi manevi her türlü desteği sağlayan ve bilimsel anlamda kendisinden çok şey öğrendiğim danışman hocam Prof. Dr. Münir AKTAŞ ve anabilim dalı değerli hocalarımız Prof. Dr. Nazir DUMANLI, Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU, Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK ve Prof. Dr. Cem Ecmel ŞAKI'ye desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Laboratuvar yöntemlerinin uygulanmasında katkılarını aldığım Prof. Dr. Kürşat ALTAY, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Fatih AYDIN ve Yrd. Doç. Dr. Engin BERBER'e;

Maddi ve manevi yönden benimle beraber olan aile bireylerime, desteğini hep yakından hissettiğim eşime ve canım kızım Esmâ Ada ÖZÜBEK'e;

Parazitoloji alanında doktora yapmama vesile olan çok kıymetli arkadaşlarım ve meslektaşlarım Veteriner Hekim Yavuz KAYA ve Veteriner Hekim Ali ASAR'a;

Veteriner fakültesinde bulunan Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma;

Anabilim dalımız emekli müstahdemi Ramazan DEMİR'e;

Çemişgezek Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü personeline;

Tez örneklerimin toplanmasında emeği geçen çok kıymetli meslektaşlarım Doktora öğrencisi Veteriner Hekim Harun Kaya KESİK, Veteriner Hekim İbrahim BİLİR, Veteriner Hekim Ali DEMİRBİLEK, Veteriner Hekim Volkan BOZKURT, Veteriner Hekim Hasan KILINÇ, Veteriner Hekim Muhittin BULUT, Veteriner Hekim Servet AYYILDIZ, Veteriner Hekim Sırrı ÖZTÜRK, Veteriner Hekim Mehmet Fatih GÖKHAN, Veteriner Hekim Durmuş MAVRUZ, Veteriner Hekim Şenol KOŞAN, Veteriner Hekim Hakan TALAN, Veteriner Hekim Taner SARIBAŞ, Veteriner Hekim Hüseyin TAŞ, Veteriner Hekim Üzeyir CAN ile Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı

il ve ilçe müdürlüklerinde görev yapan meslektaşlarma ve hayvan yetiştiricilerine teşekkür ederim.

Bu alışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından VF 1420 nolu proje kapsamında desteklenmiştir. Bu desteklerinden dolayı FÜBAP koordinasyon birimine teşekkür ederim. Doktora eğitimim sırasında 108 G 126 nolu proje kapsamında burs desteği aldığım Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

II.Onay Sayfası	ii
III.Teşekkür	ii
IV.İçindekiler.....	v
V.Tablo Listesi	vii
VI.Şekil Listesi	viii
VII.Kısaltmalar Listesi	ix
1. Özet.....	1
2. Abstract.....	3
3. Giriş	5
4.Gereç ve Yöntem	26
4.1 Çalışma alanı ve örnek sayısı	26
4.2 Örneklerin toplanması	29
4.3 Laboratuvar çalışmaları	30
4.3.1 Kan frotilerinin incelenmesi	30
4.3.2 Kene identifikasyonu ve yumurta kümelerinin elde edilmesi	30
4.3.3 Genomik DNA ekstraksiyonu	31
4.3.4 Referans genomik DNA izolatları	31
4.3.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	32
4.3.6 PZR ürünlerinin görüntülenmesi	34
4.3.7 RLB membranının hazırlanması.....	34
4.3.8 Reverse Line Blotting	35
4.3.9 RLB’de kullanılan primer ve problemler	36
4.3.10 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	37

4.3.11 DNA dizilimi, genetik karşılaştırmalar ve filogenetik analiz.....	38
4.4 Çalışmada kullanılan malzemeler.....	41
4.4.1 Mikroskopide kullanılan solüsyonlar	41
4.4.2 Jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar	42
4.4.3 PZR için gerekli solüsyonlar	42
4.4.4. RLB'de kullanılan solüsyonlar	43
4.4.5 Agaroz Jel Hazırlama	45
4.4.6 İstatistiksel Analiz	45
5. Bulgular	46
5.1 PZR ve RLB'nin optimizasyonu ve spesifitesi	46
5.2 DNA dizileme ve genetik karşılaştırmalar	48
5.3 Yeni prob dizaynı	51
5.4 Filogenetik analiz	53
5.5 Mikroskopik muayene	56
5.6 Koyun ve keçilerde <i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> Enfeksiyonlarının Prevalansı	58
5.7 <i>Theileria annulata</i> ve <i>T. lestoquardi</i> 'nin RFLP ile ayırımı	62
5.8 Kene türleri.....	64
6. Tartışma.....	66
7. Kaynaklar.....	81
8.Özgeçmiş	99

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: 2012 TÜİK verilerine göre projenin yürütüldüğü illerdeki koyun ve keçi sayıları.	26
Tablo 2: Çalışmanın yürütüldüğü odaklar ile bu odaklarda koyun ve keçilerden toplanan örnek sayıları ve odaklara göre dağılımı.....	30
Tablo 3: DNA amplifikasyonunda kullanılan Touch Down PZR ısı şartları	33
Tablo 4: Touch Down PZR reaksiyonu içeriği.....	33
Tablo 5: RLB’de kullanılan proplar ile nükleotid dizilimleri ve konsantrasyonları.	37
Tablo 6: RFLP işleminde kullanılan primerler ve PZR şartları.....	38
Tablo 7: RFLP analizinde kullanılan restriksiyon enzimi ve karışımı oluşturan ürün miktarları.	38
Tablo 8: Sekansların elde edilmesi için yapılan nested PZR ve PZR şartları ile primerlere ait nükleotid dizilimleri.....	40
Tablo 9: <i>Babesia</i> sp. genotipi ile diğer <i>Babesia</i> tür ve genotipleri arasındaki yüzde benzerlik analizi.....	50
Tablo 10: Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illerinde mikroskopik bakı, PZR ve RLB sonuçlarının odaklara dağılımı.....	58
Tablo 11: Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman’da koyun ve keçilerde RLB ile <i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> türlerinin dağılımı.....	61
Tablo 12: Koyun ve keçilerden toplanan kenelerin konak ve odaklara göre dağılımı.	65
Tablo 13: Koyun ve keçilerden toplanan ixodid kene türlerinin konak ve odaklara göre dağılımı.....	65

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1:** Çalışmanın yürütüldüğü il ve ilçeler.....27
- Şekil 2:** Laboratuvar görüntüleri.....41
- Şekil 3:** RLB-F2/RLB-R2 primerleri ile elde edilen *Theileria* ve *Babesia* tür ve genotiplerine ait amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüsü.....46
- Şekil 4:** Pozitif kontrol ve saha örneklerine ait PZR ürünlerinin RLB görüntüsü.48
- Şekil 5:** *Babesia* sp. V5, *Babesia* sp. V8, *B. crassa*, *B. motasi* ve *B. ovis* sekanslarına ait Multiple Alignment sonuçları.....52
- Şekil 6:** Bu çalışmada tanımlanan *Babesia* sp. izolatına ait 18S rRNA gen sekansları ile BLAST analizinde bunlara yakın benzerlik gösteren diğer *Babesia* tür ve genotiplerine ait sekansların oluşturduğu filogenetik ağaç54
- Şekil 7:** Bu çalışmada tanımlanan *Babesia* sp. izolatına ait 18S rRNA gen sekansları ile GenBank'ta mevcut diğer piroplazmidlere ait sekansların oluşturduğu filogenetik ağaç55
- Şekil 8:** Doğal enfekte koyunlarda eritrosit içerisinde tek ve çift armut formunda *Babesia ovis* piroplazmalarının mikroskopik görüntüsü (orijinal).....56
- Şekil 9:** Doğal enfekte koyunlarda eritrosit dışında tek ve çift armut formunda *Babesia ovis* piroplazmalarının mikroskopik görüntüsü (orijinal).....57
- Şekil 10:** Doğal enfekte bir koyunda eritrosit içerisinde *Theileria ovis* piroplazm formu (orijinal).....57
- Şekil 11:** RLB'de *T. lestoquardi* ve *T. annulata* probuna sinyal veren örneklerden amplifiye edilen (18S rRNA gen) PZR ürünlerinin Hpa II enzimi ile restriksiyonu sonucunda oluşan bant profillerinin agarose jel görüntüsü.....63

KISALTMALAR LİSTESİ

μl	:	Mikrolitre
μm	:	Mikrometre
bç	:	Baz çifti
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DNaz	:	Deoksiribonükleaz
dNTP	:	Deoksinükleotriofosfat
ECL	:	Chemileluminecent Detection Agent
EDAC	:	1-ethyl-3 (dimethylaminopropyl) carbodimiimine
EDTA	:	Etilendiamintetra-asetik asit
gDNA	:	genomik DNA
HCl	:	Hidroklorik asit
IFAT	:	İndirek Floresan Antikor Testi
ITS	:	Internal Transcribed Spacers
KCl	:	Potasyum klorür
LAMP	:	Loop Mediated Isothermal Amplification
M	:	Molar
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
- TBE** : Tris-Borik asit-EDTA tampon solüsyonu
- TÜİK** : Türkiye İstatistik Kurumu
- UV** : Ultraviyole

1. ÖZET

Bu çalışma, Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illerinde koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin varlığı ve yaygınlığının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, 2013/2015 yılları arasında bu illere gidilerek 421'i koyun, 379'u keçi olmak üzere toplam 800 hayvandan EDTA'lı tüplere kan örneği alınmış, alınan kan örneklerinden sürme frotiler hazırlanarak Giemsa ile boyanmış ve mikroskopta *Theileria* ve *Babesia* piroplazmaları yönünden incelenmiştir. EDTA'lı kanlardan ekstrakte edilen *Theileria* ve *Babesia* piroplazm DNA'ları, RLB-F2 ve RLB-R2 primerleri kullanılarak PZR'de amplifiye edilmiştir. Elde edilen amplifikasyon ürünleri, *Theileria* ve *Babesia* soy ve türlerine özgü problemlerin bağlandığı bir membran üzerinde hibridizasyona (RLB) tabi tutulmuştur.

Kan örneği alınan hayvanlar aynı zamanda ixodid kene enfestasyonları yönünden kontrol edilmiş ve mevcut keneler toplanmıştır. Toplanan keneler stereo mikroskop altında incelenmiş ve tür identifikasyonları yapılmıştır. Doymuş dişi keneler, 28°C ısı ve %85 nispi nemi sağlayan etüvde tutularak yumurtlamaları sağlanmıştır. Yumurta kümeleri, *Babesia* türleri yönünden RLB ile incelenmiştir.

Kan frotilerinin mikroskopik bakışında 45 koyun (%5,62) ve 11 (%1,37) keçi olmak üzere toplam 56 (%7) hayvan *Theileria* veya *Babesia* piroplazm formları yönünden pozitif bulunmuştur.

Bölgedeki koyun ve keçilerin üç farklı *Theileria* (*Theileria ovis*, *Theileria annulata*, *Theileria* sp. MK), iki farklı *Babesia* türü ya da genotipi (*Babesia ovis*, *Babesia* sp.) ile enfekte oldukları belirlenmiştir. *Babesia* sp.'nin genetik karşılaştırması, bu genotipin 18S rRNA geni GenBank'taki mevcut bütün koyun

ve keçi *Babesia* tür ve genotiplerinden açık bir şekilde farklılık göstermiştir. Bu izolatın, *Babesia odocoilei* ve *Babesia* sp. EU1 ile %98'e yakın bir benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

RLB yöntemi ile 800 örneğin 292 (%36,5)'sinin *Theileria* veya *Babesia* yönünden pozitif olduğu saptanmış, *Theileria* prevalansının %34,12 (273/800), *Babesia* prevalansının ise %6,62 (53/800) olduğu belirlenmiştir. Bölgedeki koyun ve keçilerde en yaygın kan parazitinin %31,12 ile *T. ovis* olduğu, bunu %5,75 ile *B. ovis*, %2,87 ile *T. annulata*, %0,87 ile *Babesia* sp. ve %0,25 ile *Theileria* sp. MK'nın takip ettiği görülmüştür. *Babesia* sp. sadece keçilerde, *Theileria* sp. MK ise sadece koyunlarda tespit edilmiştir. Bölgedeki koyun ve keçilerde diğer *Theileria* tür (*Theileria lestoquardi*, *Theileria luwenshuni*, *Theileria uilenbergi*) ve genotipleri (*Theileria* sp. OT1, *Theileria* sp. OT3) ile *Babesia* türlerine (*Babesia motasi*, *Babesia crassa*) rastlanmamıştır.

Kan örneği alınan koyun ve keçilerden 546 adet kene toplanmış ve bunlar *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *Haemophysalis parva*, *Hyalomma excavatum* ve *Hyalomma anatolicum* olarak teşhis edilmişlerdir. Yumurtlamak üzere etüve alınan doymuş erişkin dişi kenelerden 72 (36 *R. bursa*, 30 *R. turanicus*, 6 *Hae. parva*) yumurta kümesi elde edilmiş, bunlardan *R. bursa*'ya ait 2 yumurta kümesinde *B. ovis* tespit edilmiştir.

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

2. ABSTRACT

Investigation of *Theileria* and *Babesia* species in sheep and goat from Adana, Mersin, Gaziantep and Adiyaman provinces

This study was carried out to determine the presence and distribution of *Theileria*, *Babesia* species in sheep and goats in Adana, Mersin, Gaziantep and Adiyaman provinces. For this purpose, the region was visited in 2013-2015 and a total of 800 blood samples comprising 421 sheep and 379 goats were collected from the animals by using the vacutained tubes containing EDTA. Blood smears were prepared from the blood samples and stained with Giemsa and examined for the presence of *Theileria* and *Babesia* piroplasms. *Theileria* and *Babesia* piroplasm DNAs extracted from bloods with EDTA were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using RLB-F2 and RLB-R2 primers. For reverse line blot hybridization (RLB), the PCR products were hybridized to a membrane onto which catchall and species-specific oligonucleotide probes.

At the same time, the animals taken from blood sample were checked for ixodid tick infestation and existing ticks were collected. Collected ticks were examined for identification under the stereo microscope. The fully engorged female ticks were selected for ovipositioning, and maintained in an incubator at 28°C, 85% relative humidity until they oviposited. The egg masses were screened by RLB for the presence of *Babesia* species.

A total of 56 animals (7%) including 45 sheep (5.62%) and 11 goats (1.37%) were found to be positive for *Theileria* or *Babesia* spp. piroplasms in microscopic examination of blood smears.

Three *Theileria* (*Theileria ovis*, *Theileria annulata*, *Theileria* sp. MK) and two *Babesia* (*Babesia ovis*, *Babesia* sp.) species or genotypes were identified in sheep and goats in the region. The genetic comparison of the *Babesia* sp. revealed that this genotype was found to be clearly different from all ovine and caprine *Babesia* species or genotype available in GenBank. The genotype showed a close similarity to 98% between their 18S rRNA genes with the previously described sequences of *Babesia odocoilei* ve *Babesia* sp. EU1.

Using RLB, 292 out of 800 samples (36.5%) were found to be infected with *Theileria* or *Babesia* species. Prevalence of *Theileria* was determined as 34.12% (273/800), whereas the prevalence of *Babesia* was 6.62% (53/800). The most abundant *Theileria* species identified was *T. ovis* with 31.12%, followed by *B. ovis* 5.75%, *T. annulata* 2.87%, *Babesia* sp. 0.87% and *Theileria* sp. MK 0.25%. *Babesia* spp. was detected in goats with 0.87%, whereas *Theileria* sp. MK was detected in sheep (0.25%). The other *Theileria* (*T. lestoquardi*, *T. luwenshuni*, *T. uilenbergi*, *Theileria* sp. OT1, *Theileria* sp. OT3) and *Babesia* (*B. motasi*, *B. crassa*) species and/or genotype were not detected.

A total of 546 ticks were collected from sheep and goats in the region. Ticks were identified as *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *Haemophysiyalis parva*, *Hyalomma excavatum* and *Hyalomma anatolicum*. A total of 72 egg masses obtained from *R. bursa* (n=36), *R. turanicus* (n=30) and *Hae. parva* (n=6) were included in this study. Of the egg masses examined, 2 *R. bursa* egg masses were positive for *B. ovis*.

Key words: Sheep, goat, *Theileria*, *Babesia*, microscopy, RLB, tick.

3. GİRİŞ

İnsanların beslenmesi ve giyinip barınması için uygun bir ekonomik öge olan koyun ve keçi yetiştiriciliği, aynı zamanda Anadolu kültüründe manevi bir öneme de sahiptir. Günümüzde, ülkemizin artan nüfusunun yeterli ve dengeli beslenmesinin sağlanması yanında hayvancılığa dayalı sanayiye hammadde temini açısından da koyun ve keçi yetiştiriciliğinin teşvik edilmesi gerekir. Dünya üzerinde bulunan üç milyar çift tırnaklının, iki milyarını koyun ve keçi oluşturmaktadır. 2013 FAO verilerine göre dünyada 1.172.833.189 koyun 1.005.603.002 keçi bulunmaktadır (1). Ülkemizde ise 2014 yılı TÜİK verilerine göre sığır, koyun ve keçi varlığı sırasıyla 14.123.000, 31.115.000, 10.347.000 baş olarak bildirilmiştir (2).

Ülkemiz, coğrafi özellikleri bakımından subtropik iklim kuşağında yer alması nedeniyle ixodid keneler ve bunların naklettikleri patojenler için uygun ortam oluşturmaktadır. Kenelerin yaklaşık 200 kadar hastalık etkeni ile doğrudan ya da dolaylı bir ilişkilerinin olduğu, bu patojenlerin bir kısmına biyolojik vektörlük yaptıkları bilinmektedir (3). Bu patojenlerden özellikle *Theileria* ve *Babesia* türleri, ülkemizin de içinde yer aldığı geniş bir coğrafyada yaygın olarak görülmekte, evcil ve yabani hayvanlarda klinik ve subklinik enfeksiyonlar oluşturarak önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (4, 5). Çin'nin kuzeyinde yapılan bir araştırmada yaklaşık 35 milyon küçükbaş (koyun ve keçi) hayvanın, *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* türlerinden en az biri ile enfekte olduğu, bu parazitlerin oluşturduğu hastalıklardan kaynaklanan yıllık kaybın hayvan başına en az iki doları bulduğu tahmin edilmektedir (6). *Theileria parva*

(*T. parva*)'nın Afrika'da her yıl bir milyondan fazla sığırın ölümüne yol açtığı ve yaklaşık 300 milyon dolar maliyet oluşturduğu bildirilmiştir (7). Kayseri yöresinde yapılan bir araştırmada, tropikal theileriosis'e bağlı yıllık kaybın 132.000 dolar olduğu bildirilmiştir (8).

Hayvan hareketlerinde artış, iklim ve çevresel değişiklikler, kenelerin yaşam alanlarını genişletmektedir. Bu durumun, ilerleyen yıllarda keneler ile nakledilen hastalıkların artışına neden olacağı tahmin edilmektedir (9).

Apicomplexa kökaltında bugüne kadar yaklaşık 6000 protozoon türü isimlendirilmiş olup, bunların çoğu zorunlu hücre içi parazitlerdir. Bu protozoonların bazıları insan ve/veya hayvanlarda önemli hastalıklara sebep olurlar. Apicomplexa kökaltında yer alan protozoonların ortak özellikleri, enfekte ettikleri omurgalı ve omurgasız konaklarda hücreyi bulmada, hücreye girmede ve hücreye adapte olmada görev üstlenen apikal kompleks organeline sahip olmalarıdır. Bu subphylum, Coccidia, Gregarinasina (gregarinler), Haemospororida (haemosporidianlar) ve Piroplasmorida (piroplasmidler) olmak üzere dört diziye ayrılır (10). Piroplasmorida dizisinde yer alan protozoonların biyolojileri tam anlamıyla bilinmemekte ve gün geçtikçe yeni türler tanımlanmaktadır. *Theileria* ve *Babesia* soylarında bulunan protozoonlar bu dizi içerisinde yer alırlar. *Theileria* cinsi, sporozoitlerin lökositleri enfekte etmesi, olgun şizontlardan merozoitlerin oluşması ve daha sonra merozoitlerin piroplazm formları oluşturmak üzere eritrositleri enfekte etmesi ile karakterizedir (11).

Theileria ve *Babesia* türlerinin Systema Naturae 2000'e göre sistematikteki yerleri aşağıdaki gibidir (12).

Biota (Canlılar)

Domain: **Eukaryota** Chatton,1925

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

Subkingdom: **Bicilialata**

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

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

Subphylum: **Apicomplexa** Levine, 1970

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

Order: **Piroplasmorida** Wenyon, 1926

Family: **Theileriidae** du Toit, 1918

Genus: **Theileria** Bettencourt, 1907

Family: **Babesiidae** Poche, 1913

Genus: **Babesia** Starcovici, 1893

Robert Koch Tanzanya'nın Dar-es-salam bölgesinde sığırlarda "Redwater" hastalığını araştırırken hasta sığırların eritrositlerinde *Babesia bigemina* (*B. bigemina*)'dan daha küçük, çomak, oval ve yuvarlak yapılı cisimlerin bulunduğunu görmüş, ancak bunların *B. bigemina*'nın genç formları olduğunu düşünmüştür. Rodezya'nın güneyinde ve Güney Afrika'da çıkan Rodezya kene sıtması salgını (Doğu Sahil Humması) üzerine Koch ve Theiler gibi araştırmacılar, bu hastalığın etiyojisi ve bulaşmasına yönelmişlerdir. Stephens ve Christophers 1903'te hastalık etkenine *Piroplasma kochi* ismini önermiş, bundan bir yıl sonra ise Koch 'mavi cisimcikler' olarak bilinen lenfoid hücre içi

aşama olan şizontları tanımlamıştır. Doğu sahil humması etkeni 1904 yılında Theiler tarafından *Piroplasma parvum*, 1907 yılında Bettencourt, França ve Borges tarafından *T. parva* olarak değiştirilmiştir. Son olarak 1918'te *Theileria* türlerinin diğer piroplaslardan farkı belirlenmiş ve Theileridae ailesi oluşturulmuştur (13).

Theileridae ailesinde yer alan türler, evcil ve yabani hayvanlarda theileriosis olarak adlandırılan hastalığa neden olurlar. Bu hastalık, lenf yumrularında büyüme, anemi ve yüksek ateş ile karakterize olup Ixodidae ailesine bağlı kene türleri tarafından transtadial olarak nakledilir. Theileriosis, sığır, koyun ve keçi gibi ruminantlarda önemli ekonomik kayıplara neden olur (4).

Koyun ve keçilerde *Theileria lestoquardi* (*T. lestoquardi*), *Theileria uilenbergi* (*T. uilenbergi*), *Theileria luwenshuni* (*T. luwenshuni*), *Theileria ovis* (*T. ovis*), *Theileria separata* (*T. seperata*) ve *Theileria recondita* (*T. recondita*) olmak üzere altı tür tespit edilmiştir (4, 14-18). *Theileria* türleri arasında patojenite, vektör kene, biyolojik ve genetik özellikler bakımından önemli farklılıklar bulunmaktadır. *T. lestoquardi*, *T. uilenbergi* ve *T. luwenshuni* koyun ve keçilerde yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden klinik (4, 15-18), diğer türler ise subklinik enfeksiyona neden olurlar (19, 20).

Theileria türlerinin biyolojisi farklılıklar göstermekle birlikte, temelde benzerdir. Parazitlerin yaşam siklusu, Ixodidae ailesinde yer alan keneler ile çeşitli memeli hayvanlar arasında geçer. Bu siklus, vektör kenelerin enfekte hayvanlardan kan emmesi ile başlar. Larva ve nimf safhasında enfekte hayvandan kan emen vektör keneler, kanla birlikte eritrositler içindeki etkenleri de alırlar. Alınan enfekte eritrositler kene bağırsağında sindirilir ve piroplasmalar serbest hale

gelir. Bunlardan mikro ve makrogametler şekillenir ve mikrogametin makrogameti döllemesi sonucu zigot oluşur. Zigotun oluşmasından sonra hareketli kinetler şekillenir ve bu kinetler bağırsak epitel hücrelerine girerler. Kenenin gömlek değiştirmesini takiben hemolenfe geçerek tükürük bezi asini hücrelerine gelen kinetler, burada sporoblastları oluştururlar. Vektör kene, konağa tutunup kan emdiğinde sporogonik gelişme başlar ve memeli hayvanlar için enfektif form olan sporozoitlerin teşekkülü ile parazitin kenedeki gelişmesi tamamlanmış olur (21).

Enfekte keneler tarafından konağa verilen sporozoitler, hızla lenfositlere girerek burada şizontları oluştururlar. Bu esnada konak hücreyi de bölünmeye teşvik ederler ve lenfositlerin clonal bölünmesine neden olurlar. Önce makroşizontlar, daha sonra mikroşizontlar ve sonunda merozoitler şekillenir. Merozoitler de eritrositlere girerek piroplasm formlarını oluştururlar (21).

Theileria türlerinin eritrositler içindeki piroplasm formları yuvarlak, oval, yüzük, batone, anaplasmod, armut ya da çomak şeklindedirler. Bu formların büyüklüğü 0,5-2 µm arasında değişir (22).

Theileria lestoquardi eritrositler içerisinde yuvarlak, oval, batone ya da anaplasmod formlarda bulunur. Etkenlerin %80'inin yuvarlak ve oval, %18'inin çubuk, %2'sinin ise anaplasmod formda olduğu bilinmektedir. *T. lestoquardi*'nin şizont formlarına lenf yumruları, dalak ve serbest lenfoblastoid hücrelerde rastlanır. Şizontların büyüklüğü ortalama 8 µm olup, kırmızımsı mavi renkte, 1-2 µm çapındadırlar ve 1-80 adet granül ihtiva ederler (23).

Theileria uilenbergi ve *T. luwenshuni* arasında morfolojik ve biyolojik yapı itibari ile bir farklılığın bulunmadığı, ancak bu iki *Theileria* türünün filogenetik olarak bir birinden farklı oldukları bildirilmiştir (24). Her iki türün eritrosit içindeki piroplasm formları, 1-2,5 µm büyüklüğünde olup pleomorfik yapıdadırlar (25). Yuvarlak ve oval formlar baskın olmakla birlikte tipik olarak tek armut, yüzük, paraşüt, noktalı virgül, tırnak, çubuk ve ameboid formlarda da görülürler (15). Bu türlerin eritrositlerdeki piroplasm formlarının %32,7'sini yüzük, %29,2'sini paraşüt, %15,3'ünü noktalı virgül, %10,2'sini oval, %5,5'ini tırnak ve %5'ini ise çubuk formlar oluşturur (26). Karaciğer, dalak, akciğer, böbrek ve perifer lenf nodüllerinden hazırlanan preparatlarda, *T. uilenbergi* ve *T. luwenshuni*'ye ait makro ve mikro şizontlar tespit edilmiştir (27).

Theileria ovis'in piroplasm formları *T. lestoquardi*'ye benzer ancak *T. lestoquardi*'de görülen çomak formlara bu türde rastlanmaz. Bazı yazarlar, *T. ovis*'i farklı türlerin oluşturduğu bir kompleks olarak tanımlamıştır. *T. ovis* ile enfekte eritrositlerde sitoplazma içinde silik bir peçe bulunur. *T. ovis* enfeksiyonlarında eritrositlerin %2'sinden daha azı enfektedir. Bu türün şizontları lenf yumrusu, dalak ve karaciğer ile serbest lenfoblastoid hücrelerde bulunur (20).

Theileria separata yuvarlak, oval, bazen çomak şeklinde piroplasm formlara sahiptir. *T. separata* ile enfekte eritrositlerin bir kenarlarındaki çöküntüde iyi şekillenmiş bir peçe ve enfekte eritrositin içinde nokta şeklinde bir leke bulunur (28).

Theileria türleri, ixodid keneler ile biyolojik olarak nakledilmektedir (22). Ancak bu parazitlerin, lenfoid doku emülsiyonu, enfekte doku kültürü hücreleri ve enfekte kan inokülasyonu ile mekanik olarak da bulaşabileceği ifade edilmiştir (29, 30).

Theileria lestoquardi saha şartlarında *Hyalomma anatolicum* (*Hy. anatolicum*) tarafından nakledilir (4, 20). Hastalığın bu kenenin bulunduğu bölgelerde (Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Orta Doğu) yoğun olarak görüldüğü bilinmektedir. Ancak *Hy. anatolicum*'un görülmediği Sudan'ın Mavi Nil bölgesinde, koyunlarda IFAT ile %14 oranında *T. lestoquardi*'ye karşı seropozitiflik belirlenmiş ve bu parazitin diğer kene türleri tarafından da nakledilebileceği ileri sürülmüştür (31).

Deneysel çalışmalarda *T. lestoquardi*, *Hy. anatolicum* ve *Rhipicephalus* türleri tarafından nakledilmiştir (32). Suudi Arabistan'ın batı bölgesinde *T. lestoquardi* ile enfekte koyunlarda *Hyalomma impeltatum* (*Hy. impeltatum*) enfestasyonu görülmüş ve bu kene türünün de parazitin potansiyel vektörü olabileceği ileri sürülmüştür (33). İran da yapılan bir çalışmada *T. lestoquardi* ile doğal enfekte koyunlardan toplanan *Hy. anatolicum* ve *Rhipicephalus sanguineus* (*R. sanguineus*) türü kenelerin tükürük bezlerinde *T. lestoquardi* sporozoitleri gösterilmiştir (34).

Theileria luwenshuni ve *T. uilenbergi* *Haemaphysalis qinghaiensis* (*Hae. qinghaiensis*) ve *Haemaphysalis longicornis* (*Hae. longicornis*) türü keneler ile nakledilmektedir. Deneysel çalışmalarda, *Hae. qinghaiensis*'in nimf ve erişkin formlarının *T. uilenbergi* ve *T. luwenshuni*'yi naklettiği belirlenmiştir. Yine *Hae. longicornis*'in nimf ve erişkin formlarının *T. luwenshuni*'yi naklettiği, *T.*

uilenbergi'nin ise *Hae. longicornis*'in sadece erişkinleri ile nakledildiği tespit edilmiştir (35, 36). Yeni tanımlanan bu *Theileria* türlerinin (*T. uilenbergi* ve *T. luwenshuni*), *Hy. anaticum* tarafından deneysel olarak nakledilmediği ortaya konmuştur (37).

Theileria ovis dünyanın farklı coğrafik bölgelerinde farklı kene türleri tarafından nakledilmektedir. Güney Afrika'da *Rhipicephalus evertsi* (*R. evertsi*) (38), *Rhipicephalus bursa* (*R. bursa*) (13), *Rhipicephalus haemaphysaloides* (*R. haemaphysaloides*) (39), *Hy. anaticum* (20), İngiltere'de *Haemaphysalis punctata* (*Hae. punctata*) (40), eski Sovyetler Birliği'nde *R. bursa*, *Dermacentor sylvarum* (*D. sylvarum*), *Haemaphysalis sulcata* (*Hae. sulcata*) ve *Ornithodoros lahorensis* (*O. lahorensis*) tarafından nakledildiği bildirilmiştir (22, 30). Deneysel olarak *R. evertsi* (38), *Hae. punctata* (40), *R. haemaphysaloides* (39), *Hy. anaticum* (20, 41) ve *R. bursa*'nın (13) *T. ovis*'i transtadial yolla naklettiği ortaya konmuş, koyunlar üzerinden toplanan *R. bursa*'nın tükürük bezi asini hücrelerinde PZR ile *T. ovis* sporozoitleri tespit edilmiştir (42).

Theileria recondata'nın *Hae. punctata* tarafından nakledildiği bildirilmiş (20), ancak daha sonra yapılan bir çalışmada sahadan toplanan *Hae. punctata* nimflerinin bu paraziti nakletmediği ortaya konmuştur (43).

Babesiosis, *Babesia* türlerinin meydana getirdiği, tropik ve subtropik bölgelerde evcil ve yabani hayvanlarda yaygın olarak görülen zoonotik karakterli bir protozoer hastalıktır (44). Hastalık ilk kez 1888 yılında Victor Babes tarafından Romanya'da şiddetli hemolitik belirti gösteren sığırlarda tanımlanmış ve etken *Haematococcus bovis* olarak isimlendirilmiş, daha sonra aynı araştırmacı tarafından benzer mikroorganizmaların koyun eritrositlerinde de bulunduğu

bildirilmiştir (45). Smith ve Kilborne tarafından 1893 yılında sığırlarda Texas fever'ın etkenine *Pyrosoma bigeminum* ismi verilmiş ve bu etkenin bir kene tarafından nakledildiği gösterilmiştir (46). Aynı yıl Starcovici bu parazitlere *Babesia bovis* (*B. bovis*), *Babesia ovis* (*B. ovis*) ve *B. bigemina* isimlerini vermiştir (47).

Ixodid keneler tarafından transtadial ve transovarial olarak nakledilen *Babesia* etkenleri, evcil ve yabani omurgalıların eritrositlerine yerleşerek gelişmelerini sürdürürler ve konaklarında yüksek ateş, intravasküler hemoliz, anemi, hemoglobinüri ve hemoglobinemi ile karakterize hastalık tablosu oluştururlar (4). *Babesia* soyuna bağlı türlerden *B. ovis*, *Babesia motasi* (*B. motasi*), *Babesia crassa* (*B. crassa*), *Babesia taylori* (*B. taylori*) ve *Babesia foliata* (*B. foliata*)'nın koyun ve keçilerde babesiosis'e sebep olduğu bildirilmiştir (4, 22, 48-53).

Babesia türlerinin biyolojisi omurgalı konaklar ile Ixodidae ailesine bağlı mera keneleri arasında geçer. *Babesia* türleri keneler tarafından hem transtadial ve hem de transovarial olarak nakledilir (54). Enfekte kene duyarlı konağa kan emmek için tutunduğunda, sporozoitleri konağa enjekte eder ve sporozoitler direk olarak endositosis yolu ile eritrositlere girerler. Sporozoitin temas ettiği eritrositin yüzeyinde, önce aktin ve miyozinin rol aldığı mekanizma ile bir invaginasyon meydana gelir. Bunu takiben sporozoitler vakuol oluşturmadan direkt olarak konak eritrositlerine girerler. Eritrositler içerisine giren sporozoitler, piroplasm (trofozoit) formuna dönüşerek gelişmesini sürdürür ve genellikle ikiye bölünerek çoğalırlar. Eritrositlerin parçalanması ile birlikte serbest kalan merozoitler aynı şekilde sağlam eritrositlere penetre olurlar. Çoğalma genellikle ikiye bölünme ile

olmakla beraber bazen dörde bölünmede söz konusu olabilir ve *B. crassa*'da olduğu gibi bazen merozoit sayısı dördü de bulabilir. Enfeksiyon konağın ölümüne veya immun sistemin olayı baskılamasına kadar devam eder (22, 54, 55).

Vektör keneler enfekte hayvandan kan emerken "Gamont prekürsörleri" adı verilen oval şekilli merozoitleri alırlar. Bu gamont prekürsörleri, vektör kene tarafından alınıncaya kadar gelişmezler. Gamontlar vektör kene tarafından alındıktan sonra kenenin sindirim sisteminde strahlenkörper adı verilen ışınsal cisimcikler meydana gelir. Bunların bölünerek çoğalmasıyla çok çekirdekli ışınsal cisimcikler oluşur. Tek çekirdekli ışınsal cisimciklerden meydana gelen gametler singami yolu ile bir araya gelerek zigotu meydana getirirler. Zigot, kenenin bağırsağında özellikle bazofilik epitel hücrelerine girerek çoğa bölünmeye başlar ve bu sırada hacim olarak da büyür. Çekirdek materyali sitoplazma boyunca küçük noktacıklar şeklinde dağılır ve her çekirdek parçasının etrafı bir zarla çevrilerek çubuk şekilli 11-15 µm uzunluğunda sporokinetler (vermikül, kinet) oluşur. Meydana gelen vermiküller kenenin hemolenfine ve ovaryumlar dahil tüm organlarına göç eder. Buldukları hücreleri parçalayan sporokinetlerin bir kısmı sağlam hücrelere girerek yeniden çoğalmaya devam ederken, bir kısmı da tükürük bezi asini hücrelerine giderek burada yuvarlaklaşırlar ve daha sonra sporogoni yoluyla çoğalarak önce sporoblastları sonra da sporozoitleri meydana getirirler. Bu esnada kene de gömlek değiştirmek suretiyle bir sonraki gelişme safhasına (larvadan nimfe, nimften erişkine) geçer. Tükürük bezlerinde gelişmesini tamamlayan sporozoitler, kenenin kan emmek üzere tutunduğu yeni duyarlı konağa verilir ve parazitin vektör kenedeki yaşam döngüsü tamamlanmış olur.

Böylece vektör kene, bir gelişme döneminde enfekte konaktan aldığı *Babesia* etkenlerini bir sonraki gelişme döneminde (transtadial nakil) diğer bir duyarlı konağa aktarır. Vektör kenenin erişkin döneminde enfekte konaktan kan emmesi durumunda, *Babesia* etkenleri ovaryumlar yoluyla kenenin yumurtalarına ve bu yumurtadan çıkan larvalara intikal eder. Enfekte larvalar duyarlı konaktan kan emerken, *Babesia* etkenlerini transovarial olarak yeni bir konağa aktarmış olur (21, 56, 57).

Babesia soyundaki protozoonlar morfolojik olarak büyük ve küçük *Babesia* türleri olarak gruplandırılırlar. Küçük *Babesia* türleri yuvarlak, tek armut ve belirsiz bir açığa sahip çift armut, büyük *Babesia* türleri ise yuvarlak, oval, tek armut ve belirgin bir açığı olan çift armut şeklinde bulunurlar. *Babesia* türlerinin piroplazmaları gelişme dönemlerine göre halka, ameboid ve armut biçimini alırlar. Çift armut şekilleri birbirinden ayrılıp, hücreyi parçalar, serbest hale gelen etkenler diğer alyuvarları enfekte ederler. (22, 58).

Babesia ovis küçük *Babesia* türlerinden olup 1,5 x 1 µm büyüklüktedir. Eritrosit içindeki formlar, çoğunlukla yuvarlak ve eritrosit kenarına yakın olarak bulunurlar. *B. motasi* büyük *Babesia* türlerinden olup, genellikle çift armut formunda ve 2,5-4 x 2 µm büyüklüğündedir (22, 59). Büyük *Babesia* türlerinden olan *B. crassa*'da bir eritrosit içinde genellikle 4 merozoit bulunur ve her merozoit 2-3 µm uzunluğundadır (50).

Babesia ovis'in primer vektörü *R. bursa*'dır. Bununla beraber *R. turanicus*, *R. evertsi*, *Hyalomma excavatum* (*Hy. excavatum*), *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) ve *Ixodes persulcatus* (*I. persulcatus*) tarafından da nakledilebileceği belirtilmiştir. *B.*

motasi Hae. punctata tarafından nakledilmektedir. *B. crassa*'nın vektörü bilinmemektedir (4, 58-62)

Theileria ve *Babesia* türlerinin teşhisinde kullanılan moleküler tekniklerdeki gelişmelere paralel olarak, son yıllarda yapılan çalışmalar, koyun ve keçilerde bu soylara bağlı yeni genotiplerin varlığını ortaya koymuştur.

İspanya'da *Theileria* sp. OT1 ve *Theileria* sp. OT3 genotipleri bildirilmiştir (63). Bunlardan *Theileria* sp. OT1'in daha önce Çin'de bildirilen ve *Theileria* sp. China 1 olarak adlandırılan ve günümüzde *T. luwenshuni* olarak isimlendirilen tür ile %99,6 oranında genetik benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *Theileria* sp. OT3'ün ise diğer türlerden genotipik olarak farklı olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'de koyun ve keçilerde yapılan çalışmada diğer *Theileria* türlerinden farklı bir genotip tespit edilmiş ve *Theileria* sp. MK olarak adlandırılmıştır (64). Bu *Theileria* genotiplerinin patojeniteleri ve vektörleri ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Çin'de koyun ve keçilerde babesiosise yol açan 7 *Babesia* izolatu tanımlanmıştır. Bu izoatların, 18S ribosomal DNA ve ITS gen bölgelerine göre iki grupta toplandığı bildirilmiştir (65, 66). Birinci grubu oluşturan 6 izolatu *Babesia* sp. BQ1 Lintan, *Babesia* sp. BQ1 Ningxian, *Babesia* sp. Tianzhu, *Babesia* sp. Madang, *Babesia* sp. Hebei, *Babesia* sp. Liaoning olduğu ve *B. motasi*-like grup olarak adlandırıldığı bildirilmiş, diğer grubun ise *Babesia* sp. Xinjiang ile birlikte Güney Afrika'da son zamanlarda yabancı ruminantlarda tanımlanan *Babesia* sp. giraffe izolatları ile İspanya'da geyiklerde identifiye edilen *Babesia* sp. pecorum izolatını içerdiği kaydedilmiştir (57, 68). Ayrıca 2010 yılında ilk defa Afrika'da yabancı kedilerde tanımlanan *Babesia lengau* sp.'nin (69), evcil kedilerde klinik

enfeksiyon oluşturduğu rapor edilmiş (70), daha sonra genetik olarak *Babesia lengau* (*B. lengau*)'ye yakın benzerlik gösteren ve *B. lengau*-like olarak adlandırılan bir izolatın, Yunanistan'da koyunlarda hemolitik anemi seyirli hastalık tablosuna neden olduğu bildirilmiştir (71). Yine *Babesia* sp. BQ1 (Ningxian)'in *Hae. longicornis* tarafından nakledildiği, Avrupa'daki *B. motasi*'ye benzer morfolojik özellikler gösterdiği ve koyun ve keçilerde son derece patojen olduğu belirtilmiştir (72). *Babesia* sp. Xinjiang'ın *B. motasi* ve *B. crassa*'dan morfolojik olarak farklı olduğu ve koyunlarda düşük patojenite gösterdiği ifade edilmiştir (73, 74).

Moleküler tekniklerin *Theileria* ve *Babesia* türlerinin teşhisinde kullanılması ile birlikte, bu soylarda yer alan bazı türlerin esas konağı dışında çeşitli memeli konaklarda da bulunabileceği görülmüştür. Sığırlarda tropikal theileriosis'e neden olan *Theileria annulata* (*T. annulata*)'nın koyunları enfekte edebildiği, gerek laboratuvar ve gerekse saha çalışmalarında gösterilmiştir (29, 75-79). Aynı protozoon köpeklerde de tespit edilmiştir (80, 81). Yine köpeklerde *Babesia caballi* (*B. caballi*), *Babesia felis* (*B. felis*), *Babesia microti* (*B. microti*) (82-84); kedilerde *Babesia canis* (*B. canis*), *Babesia vogeli* (*B. vogeli*), *T. ovis*, *B. bigemina* (85, 86); atlarda *B. microti* (87); keçilerde *B. bigemina* (88); koyunlarda *B. bigemina* ve *B. bovis* (89); geyiklerde ise *B. divergens* tespit edilmiştir (90).

Koyun ve keçilerde theileriosis ve babesiosis Ortadoğu, Akdeniz havzası, Güney Avrupa, Asya, Kuzey Afrika, Hindistan ve Çin'i içine alan geniş bir alanda görülür (4, 15, 20, 91). Klinik enfeksiyon oluşturarak koyun ve keçilerde ölüme neden olan *Theileria lestoquardi*, Güney Doğu Avrupa, Kuzey Afrika, Orta ve

Yakın Doğu ile Doğu ve Güney Doğu Asya ülkelerinde görülmektedir (4, 20, 91-93).

İran'da kan frotilerinin mikroskopik bakışı ile yapılan bir çalışmada, koyunlarda *T. lestoquardi* prevalansının %34, diğer bir çalışmada ise %36 olarak belirlenmiş (34, 94), aynı ülkede moleküler yöntemlerle yapılan çalışmalarda *T. ovis*, *T. lestoquardi*, *T. annulata*, *B. ovis* ve *B. motasi* sırası ile %6-86, %6-7, %5, %7-85 ve %1-11 oranlarında tespit edilmiştir (95-102).

Irak'ta moleküler yöntemlerle muayene edilen hayvanların %14-63'ünün *T. ovis*, %8-48'inin *T. lestoquardi*, %6'sının *T. uilenbergi*, %71'inin *T. annulata*, %2'sinin ise *B. ovis* ile enfekte olduğu bildirilmiştir (103, 104).

Pakistan'da yapılan moleküler çalışmalarda *T. ovis* %6-28, *T. lestoquardi* %3-21, *B. ovis* %34-37 oranlarında tespit edilmiştir (105-111).

Çin'de mikroskopik bakı sonuçlarına göre *Theileria* sp. China prevalansı, kuzularda, %92, oğlaklarda %64, koyunlarda %63, keçilerde %20 olarak belirlenmiş (26), moleküler çalışmalarda ise *T. luwenshuni* %6-97, *T. uilenbergi* %18-44, *T. ovis* %8, *Theileria* sp. OT3 %15 ve *T. orientalis* %9 oranlarında bulunmuştur (18, 112-116).

Sudan'ın 9 farklı coğrafik bölgesinde indirek floresan antikor testi (İFAT) ile yapılan serolojik bir çalışmada, koyunlarda *T. lestoquardi*'nin seroprevalansının %16 olduğu ortaya konmuştur (31).

Theileria ovis'in bütün Afrika; Güney, Orta ve Doğu Avrupa; Orta, Doğu ve Güney Asya ülkelerinde koyun ve keçilerde görüldüğü ve *T. lestoquardi*'den daha geniş bir coğrafyada yayılış gösterdiği bildirilmiş (20, 63, 117, 118), Mısır'da, kan frotilerinin mikroskopik bakısına dayanan bir çalışmada 475

koyunun %3'ünde, 200 keçinin %8'inde *T. ovis*'in piroplasm formları belirlenmiş (119), IFAT ile Makedonya'da 721 koyunun %25'inde, 487 keçi'nin %1'inde (120), İspanya'da muayene edilen koyunların %19'unda, keçilerin %1'inde *T. ovis*'e karşı şekillenen antikorlar saptanmış (121), Suriye'de sağlıklı görünüşlü 913 koyunun %60'ında *Theileria* spp. antikorlarının varlığı ortaya konmuş (122), İspanya'da reverse line blotting (RLB) metodunu ile yapılan bir çalışmada, 320 koyunun %21'inde *T. ovis* tespit edilmiştir (63).

Türkiye'de *Babesia* ve *Theileria* türlerinin varlığı ve yayılışına ilişkin farklı yöntemler kullanılarak çeşitli araştırma ve yayınlar yapılmıştır. *B. ovis* ilk kez 1899 yılında Nicolle ve Laveran tarafından, *T. ovis* ise 1931 yılında Lestoquard ve Ekrem tarafından saptanmış (29, 123), daha sonra mikroskopik bakı ve serolojik yöntemler ile Türkiye'nin çeşitli yerlerinde koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin varlığı ve yayılışı ortaya konmuştur.

Kayseri yöresinden 192'si koyun, 47'si keçi olmak üzere toplam 239 küçük ruminantın perifer kan frotileri incelenmiş, 34'ü koyun (%18) ve 3'ü keçi (%6) olmak üzere toplam 37 hayvanın (%15) *B. ovis* ile enfekte olduğu saptanmış, hiçbir örnekte *B. motasi*'ye rastlanmamıştır (124). Aynı yöreden 250 koyun ve 50 keçinin perifer kan frotilerinin mikroskopik muayenesinin yapıldığı diğer bir çalışmada (125), 46 koyun ve 4 keçide *Theileria* sp. tespit edilmiştir.

Orta, Doğu ve Güney Anadolu gibi Türkiye'nin değişik coğrafik bölgelerinden *Theileria* şüpheli 687 koyun ve 89 keçi muayene edilmiş, serolojik olarak koyunların %60'ı, keçilerin %9'u, mikroskopik olarak ise koyunların %38'i ve keçilerin %6'sı *T. ovis* yönünden pozitif bulunmuş, *T. lestoquardi*'ye rastlanmadığı bildirilmiştir (126). Çankırı yöresinden 128 koyun ve 66 keçiye ait

sürme kan frotisi mikroskopik olarak incelenmiş, 27 koyun ve 8 keçide *Theileria* spp. 39 koyun ve 10 keçide ise *B. ovis* belirlenmiştir (127). Türkiye’de *B. ovis*’in koyunlarda serolojik teşhisi ilk kez 1979 yılında yapılmıştır (128). Daha sonra Türkiye’nin farklı illerinde bu protozoonun koyun ve keçilerde mikroskopik ve serolojik prevalansı araştırılmış, mikroskopik olarak muayene edilen hayvanların Malatya yöresinde %2 (129)’sinde; Afyon yöresinde %0,4 (130)’ünde; Konya yöresinde %11 (131)’inde; Urfa yöresinde ise %2 (132)’sinde *B. ovis* piroplazmaları tespit edilmiştir. *B. ovis*’in koyunlardaki seroprevalansı Van yöresinde %60 (133); Ankara, Kırşehir, Erzurum illerinde IFAT ile %64, ELISA ile %61; Karadeniz bölgesinde bir yaş üstü koyunlarda %80, bir yaş altı koyunlarda %52 (134); Ankara yöresinde IFAT ile %76, ELISA ile %79 (135); Çanakkale yöresinde %46 (136); Çankırı yöresinde %91 (137); Niğde yöresinde 2001 yılında %54 (138), 2003 yılında %24 (139); Malatya yöresinde %56 (129); Elazığ yöresinde %45 (140); Afyon yöresinde %52 (130); Konya yöresinde %42 (131); Urfa yöresinde %41 (132); Samsun yöresinde %72 (141); Amasya yöresinde %38 (142); Ege, Karadeniz, Orta Anadolu ve Doğu Anadolu bölgelerinde (143) sırası ile %80, %72, %71 ve %56 olarak tespit edilmiştir. Bu protozoon Türkiye’nin çeşitli bölgelerinde serolojik yöntemler ile keçilerde de araştırılmış ve Çankırı yöresinde %86 (137); Konya yöresinde %33 (144); Niğde yöresinde %35 (139); Ankara yöresinde %9 (145); Hatay yöresinde %37 (146) oranında seropozitiflik saptanmıştır.

Theileria ve *Babesia* gibi kan parazitlerinin oluşturduğu enfeksiyonların teşhisi, akut vakalarda klinik bulgular ve Giemsa ile boyanmış kan ve lenf yumrusu frotilerinin mikroskopik muayenesiyle yapılmaktadır (26, 27). Latent

enfeksiyonların saptanmasında ise uzun süre serolojik yöntemler kullanılmıştır (31, 147, 148). Hastalığı atlatan hayvanlar portör durumuna geçerler ve keneler için enfeksiyon kaynağını oluştururlar. Portörlerin populasyon içindeki oranının bilinmesi, hastalığın epidemiyolojisi açısından önemlidir (149). *Babesia* ve *Theileria* türlerinin piroplasm formlarının morfolojik yapı itibari ile birbirlerine benzemesi sebebi ile mikroskopik muayene ile tür ayrımının yapılamayacağı; bu türler arasında çapraz reaksiyonların görülebilmesi, spesifik immun yanıtların zayıf olabilmesi ve uzun süreli portörlük durumunda antikorların her zaman tespit edilememesi gibi sebeplerden dolayı da serolojik yöntemlerde yanlış pozitif ve negatif sonuçların söz konusu olabileceği ileri sürülmüştür (78, 150, 151). Bu sebeplerden dolayı *Theileria* ve *Babesia* enfeksiyonlarının epidemiyolojilerini belirlemeye yönelik araştırmalarda moleküler tanı yöntemlerinin kullanılmasına ihtiyaç duyulmuştur. *Theileria* ve *Babesia* türlerinin teşhisinde parazit DNA'sının tespitine yönelik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), multipleks PZR, nested PZR, in situ PZR, arbitrary-primed PZR (AP-PZR), gerçek zamanlı (real-time) PCR (qPZR), polimeraz zincir reaksiyonu-restriction fragment length polymorphism (PZR-RFLP), southern blotting Loop mediated isothermal amplification (LAMP) gibi teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikler parazitin teşhisi yanında ayrıca tedavi, genetik tiplendirme, sistematik (taksonomi ve filogeni), populasyon genetiği, ekoloji, epidemiyoloji, antiparaziter ilaç ve aşı geliştirilmesi, ilaç direncinin tespiti ve parazit genom çalışmaları gibi konularda da uygulama alanı bulmuştur (152).

Türkiye’de koyun theileriosisinin moleküler yöntemlerle belirlenmesine yönelik ilk çalışma Doğu Anadolu Bölgesinde yapılmıştır. Bu çalışmada 218 koyuna ait kan frotisi mikroskopik, gDNA’lar ise önce PZR ile *Theileria* spp. yönünden incelenmiş, pozitif bulunan 90 örnek yeniden *T. lestoquardi* yönünden PZR ile incelenmiştir. Hiçbir örnekte *T. lestoquardi* tespit edilememiştir (153). Aynı bölgeden 300 koyun ve 100 keçiye ait kan örnekleri *Babesia* enfeksiyonları yönünden *B. ovis* spesifik PZR ile incelenmiş, 32 koyun ve 1 keçide (%8,25) *B. ovis* tespit edilmiştir (154). Aynı araştırmacılar Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinden 677 koyun ve 142 keçiye ait kan örneklerini mikroskopik bakı ve PZR yöntemi ile incelemişler; mikroskopik bakı ile koyunların %18,29’unda, keçilerin ise %2,88’inde *Theileria* spp. piropasmlarını saptamışlar, PZR ile koyunların %58,79’unun, keçilerin ise %11,27’sinin *T. ovis* yönünden pozitif olduğunu ortaya koymuşlardır (155).

Theileria ve *Babesia* türlerinin her biri için ayrı PZR metodunun kullanılması yerine, hayvanlarda bulunabilecek bütün kan parazitlerini bir defada ve tek işlemde ortaya koyabilecek genel bir metodun geliştirilmesinin çok daha ekonomik ve faydalı olabileceği düşüncesiyle, reverse line blotting (RLB) yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem, farklı cins ve türlere ait etkenlerin eş zamanlı olarak tanısını sağlayan, kısa sürede sonuç veren, daha az maliyeti olan ve duyarlılığı PZR’ye göre 1000 kat yüksek olan bir teşhis aracıdır (156). RLB ilk defa 1988 yılında insanlarda orak hücre anemisi ile β Talesemi’nin teşhisinde kullanılmış (157), daha sonra *Streptococci* türlerinin serotiplerinin saptanması (158) ve aynı kenede bulunan dört farklı *Borrelia* türünün belirlenmesinde

kullanılmıştır (159). Bu yöntemle sığırlarda beş *Theileria* ve üç *Babesia* türünün aynı anda spesifik olarak teşhis edilebileceği gösterilmiştir (160).

Parazitoloji alanında kullanımı her geçen gün artarak devam eden RLB yöntemi ile koyun ve keçilerde bulunan *Theileria* ve *Babesia* türleri başarı ile teşhis edilmiştir. RLB yönteminde yaygın olarak parazitlerin 18S rRNA genindeki V4 değişken bölgesi amplifiye edilmektedir (161). Morfolojik, serolojik ve genetik olarak yakın benzerliği olan *T. annulata* ve *T. lestoquardi* türlerinde V4 değişken bölgesindeki nükleotid dizilimleri aynı olduğu için bu iki parazitin RLB ile ayırımı mümkün olmamaktadır (162). Normalde sığırlarda tropikal theileriosis'e neden olan *T. annulata*'nın koyunları enfekte edebildiği gerek laboratuvar ve gerekse saha çalışmaları ile gösterilmiştir. (75-79). Dolayısı ile RLB yönteminin kullanıldığı epidemiyolojik çalışmalarda bu hususun dikkate alınması gerekmektedir. Bu durum, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemi başta olmak üzere diğer moleküler yöntemler ile aşılabilmektedir (95, 96). RFLP'de *Theileria* türlerinin 18S rRNA gen bölgesine ait amplifikasyon ürünleri (yaklaşık 1500 bp) Hpa II restriksiyon enzimi ile ligasyona tabi tutularak oluşacak bant profili ve sayısına göre tür ayırımı yapılabilmektedir (96).

Reverse Line Blotting yöntemi Türkiye'de koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin tespitinde ilk defa Kayseri yöresinde kullanılmış, koyunlarda %2,7 oranında *B. ovis*, %34,2 oranında da *T. ovis* enfeksiyonu tespit edilmiştir (163). Daha sonra Doğu Anadolu Bölgesinden 705 koyun ve 215 keçiye ait kan örnekleri *Theileria* ve *Babesia* türleri yönünden RLB ile araştırılmış ve *B. ovis* (%5,43), *T. ovis* (%34,56), *Theileria* sp. MK (%1,3) ve *Theileria* sp. OT3 (%0,43)'ün varlığı ortaya konmuştur (64). Kayseri ili Yeşilhisar yöresinde koyun

ve keçilerdeki *Theileria* ve *Babesia* türlerinin belirlenmesi amacıyla rastgele seçilen 200 koyun ve 100 keçiye ait gDNA'lar RLB ile *T. ovis* ve *B. ovis* yönünden incelenmiş ve bu yörede *B. ovis* ve *T. ovis*'in moleküler prevalansının sırası ile %3,7 ve %37,6 olduğu tespit edilmiştir (164). Kayseri'de yapılan başka bir çalışmada RLB ile 300 keçi örneğinin 4'ünde (% 1,33) *B. ovis*, 1'inde (% 0,33) *T. ovis* tespit edilmiştir (165).

Orta Anadolu bölgesindeki Kayseri, Sivas ve Yozgat illerinden 421 koyun ve 152 keçiye ait kan örnekleri RLB ile incelenmiş, *B. ovis*'in %2,6, *T. ovis*'in ise %33,9 oranında yaygın olduğu tespit edilmiştir (166). Koyun ve keçilerde aynı yöntem ile Orta ve Batı Karadeniz bölgesinde *T. ovis*'in %28,99, *B. ovis*'in %0,44, *Theileria* sp. OT3'ün %2,04 ve *Theileria* sp. MK'nın %0,62 (167); Doğu Karadeniz bölgesinde ise *T. ovis*'in %18,9, *Theileria* sp. MK'nın %0,99, *Theileria* sp. OT3'ün %0,43 oranında bulunduğu ortaya konmuştur (168).

Türkiye'de *B. motasi*'nin varlığı mikroskobik olarak Karadeniz bölgesi ile Van yöresinde bildirilmiş, ancak bu türe ilişkin moleküler bir veriye rastlanmamış (169, 170), apatojen bir tür olarak kabul edilen *B. crassa*'nın koyunlarda ve *Haemophysalis* türü kenelerde bulunduğu moleküler olarak tespit edilmiştir (16, 171, 172).

Türkiye'nin hemen her coğrafik bölgesinde koyun ve keçilerde varlığı bildirilen *Theileria* ve *Babesia* türlerinin, Akdeniz bölgesinin Mersin ve Adana yöreleri ile Güneydoğu Anadolu'nun Gaziantep ve Adıyaman illerinde de enfeksiyon oluşturdıkları bilinmektedir. Ancak bu yörelerde *Theileria* ve *Babesia* enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisi bilinmemektedir. Bu çalışmada iklim ve coğrafik yapısına bağlı olarak koyun-keçi sürülerinin idaresinde görülen

yönetimsel farklılıkların (geleneksel yörük kültürü ve göçebe hayata bağlı sürü hareketleri) moleküler epidemiyolojiyi etkileyebileceği ve farklı türlerin görülme olasılığına etki edebileceği hipotez edilmiştir. Bu hipotez temelinde Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman yörelerinde koyun ve keçi sürülerinde Theileriosis ve Babesiosis olgularının ortaya çıkmasına yol açan türlerin moleküler teknikler ile saptanması, karakterizasyonu, filogenetik analizlerinin yapılarak Genbank kayıtlarının yapılması amaçlanmıştır.



4.GEREÇ VE YÖNTEM

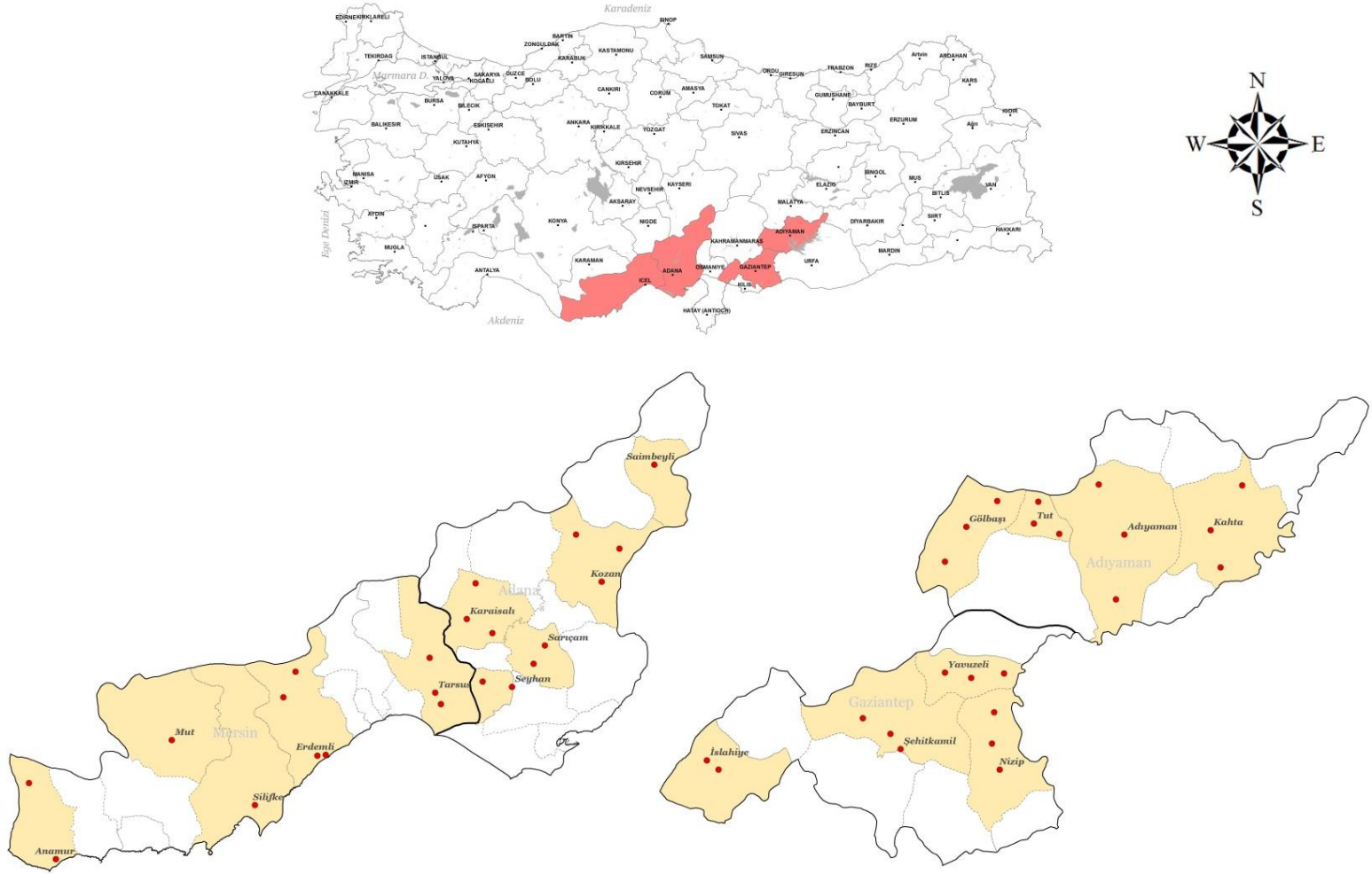
Bu çalışmada, Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illerinde koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin varlığı ve yayılışının belirlenmesi ile ilgili türlerin oluşturduğu enfeksiyonlar açısından epidemiyolojik verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. *Theileria* ve *Babesia* türlerinin teşhisinde morfolojik identifikasyon ile RLB yöntemi kullanılmış ve elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Çalışma süresince bazı odaklarda kan örnekleri alınan koyun ve keçiler üzerindeki keneler toplanarak tür tayinleri yapılmış, doymuş erişkin dişi kenelerden elde edilen yumurta kümeleri *Babesia* türlerinin varlığı yönünden kontrol edilmiştir.

4.1 Çalışma alanı ve örnek sayısı

Çalışma alanı olarak Güney Doğu ile Akdeniz bölgesinin kesişim alanı olarak görülen Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illeri seçilmiş, bu illerdeki toplam koyun ve keçi sayısının TÜİK 2012 verilerine göre 2.424.666 baş olduğu görülmüştür (Tablo 1). Çalışmada kullanılmak üzere, 2013 ve 2015 yılları Nisan – Ekim ayları arasında bu illere gidilerek koyun ve keçilerden kan ve kene örnekleri toplanmıştır. İllerdeki koyun ve keçi varlığını yansıtacak sayıda her ilde farklı odaklardan yaklaşık 200 hayvan çalışmaya alınmıştır (Şekil 1, Tablo 2).

Tablo 1: 2012 TÜİK verilerine göre projenin yürütüldüğü illerdeki koyun ve keçi sayıları.

Odak	Koyun	Keçi	Toplam
Adana	309.804	348.728	658.532
Mersin	393.309	660.325	1.053.634
Gaziantep	294.320	168.384	462.704
Adıyaman	124.684	125.112	249.796
Toplam	1.122.117	1.302.549	2.424.666



Şekil 1: Çalışmanın yürütüldüğü il ve ilçeler.

Adıyaman, Doğu Anadolu'nun Yukarı Fırat kısmı ile Güneydoğu Anadolu bölgesinin Orta Fırat bölümünde, 37°45' kuzey enlemleri ile 38°16' doğu boylamları arasında yer almaktadır. Burada Akdeniz ikliminin özelliklerini taşıyan değişik deniz iklimi ile kara iklimi hüküm sürer. Yıllık ortalama sıcaklık 17°C, yağış miktarı ise 574 mm dir. Hayvancılık, genellikle aile işletmeleri şeklinde olup son yıllarda devlet teşvikli büyük baş hayvancılık işletmeleri kurulmuştur.

Adana, Akdeniz bölgesinde 37°00' kuzey enlemleri ile 35°19' doğu boylamları arasında yer alan ve Türkiye'nin en verimli topraklarına sahip bir ildir. Adana'da coğrafi yapıya uygun olarak iklim dağlık ve ovalık kesimlerde farklılık göstermektedir. Ovalık alanın iklim yapısı Akdeniz iklimidir. Yazları sıcak ve kurak, kışları ılık ve yağmurludur. Dağlık alanlarda ise karasal iklim hakim olup, kışın yağışlar kar şeklindedir. Yıllık ortalama sıcaklık 19,3°C, yağış miktarı ise 688 mm dir. Mera ve otlaklar az olduğundan dolayı, hayvancılık daha çok Toros dağları eteklerinde koyun ve keçi yetiştiriciliği şeklinde yapılmaktadır.

Gaziantep, Güneydoğu Anadolu bölgesinde 37°03' kuzey enlemleri ile 37°22' doğu boylamları arasında yer alır. İklim Akdeniz ve Doğu Anadolu iklimleri arasında bir geçiş özelliğini gösterir. Yıllık ortalama sıcaklık 15,5°C, yağış miktarı ise 568 mm dir. Hayvancılık genellikle dağlık ve yaylalık bölgelerde küçük baş hayvan yetiştiriciliği şeklinde yapılmaktadır.

Mersin, Akdeniz bölgesinde 36°47' kuzey enlemleri ile 34°37' doğu boylamları arasında yer alır. Genellikle Akdeniz ikliminin hüküm sürdüğü Mersin'de yıllık ortalama sıcaklık 19°C, yağış miktarı ise 559 mm dir. Hayvancılık genellikle dağlık bölgede ve yaylalarda koyun ve keçi yetiştiriciliği şeklindedir (173).

4.2 Örneklerin toplanması

Nisan–Ekim 2013 ve 2015 tarihleri arasında Tablo 1 ve Şekil 6’da verilen illerdeki odaklara gidilerek, (Adana-Saimbeyli, Kozan, Sarıçam, Seyhan, Karaisalı; Mersin-Tarsus, Erdemli, Silifke, Mut, Anamur; Adıyaman-Gölbaşı, Tut, Merkez, Kahta; Gaziantep-Nizip, Yavuzeli, Şehitkamil, Islahiye) bu odaklardaki sürülerden rastgele seçilen koyun ve keçilerden DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere di-sodium ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA)’li tüplere 3 ml kan alınmıştır. Bu örneklerden sürme frotiler hazırlanmıştır.

Kan örneği alınan hayvanların kuyruk altı, perineum, scrotum, meme, prepisyum, kulak içi, boyun altı ve sternum bölgeleri ixodid kene enfestasyonu yönünden muayene edilmiş ve toplanan keneler, falkon tüplere alınmıştır. Örnek alınan hayvanların tür, ırk, cinsiyet, yaş ve kene enfestasyon durumları ile örneğin alındığı odak ve tarih bilgileri ilgili protokole kaydedilmiştir.

Kan ve kene örnekleri, +4 °C’yi sağlayan termos içerisinde Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Parazitoloji laboratuvarına getirilmiştir. Kan örnekleri DNA ekstraksiyonu yapılmaya kadar derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edilmiştir.

Saha çalışmaları sonucunda 45 farklı odak ve sürüden, 421 koyun ve 379 keçi olmak üzere toplam 800 hayvandan kan örneği alınmış, aynı sayıda sürme kan frotisi hazırlanmış ve 546 adet kene toplanmıştır. Çalışmanın yürütüldüğü odaklar ile bu odaklardan toplanan örnek sayıları ve odaklara dağılımı Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Çalışmanın yürütüldüğü odaklar ile bu odaklarda koyun ve keçilerden toplanan örnek sayıları ve odaklara göre dağılımı.

Odak	Sürü sayısı	Örnek sayısı		Toplam
		Koyun	Keçi	
Adana	11	115	85	200
Mersin	11	78	122	200
Gaziantep	11	125	75	200
Adıyaman	12	103	97	200
Toplam	45	421	379	800

4.3 Laboratuvar çalışmaları

4.3.1 Kan frotilerinin incelenmesi

EDTA'lı kanlardan hazırlanan sürme frotiler, metanol (Merck, Germany) ile 5 dakika (dk.) süre ile tespit edilmiş, %5'lik Giemsa solüsyonu ile 20-30 dk. süre ile boyanmış ve hafif akan çeşme suyu altında yıkanıp kurutulduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifte (x1000 büyütme) piroplasm (*Babesia* spp., *Theileria* spp.) varlığı yönünden incelenmiştir. Mikroskopik bakıda en az 100 mikroskop sahası incelenmiş ve en az bir etkenin görülmesi durumunda frotiler pozitif kabul edilmiştir.

4.3.2 Kene identifikasyonu ve yumurta kümelerinin elde edilmesi

Koyun ve keçiler üzerinden toplanan kenelerin morfolojik özellikleri dikkate alınarak stereo mikroskop altında tür identifikasyonları yapılmıştır (174). Tür düzeyinde identifiye edilen keneler, %70'lik ethanol içeren ependorf tüplere alınmıştır. Doymuş erişkin dişi keneler, 28°C ısı ve %85 nispi nemi sağlayan etüvde tutularak yumurtlamaları sağlanmıştır. Elde edilen yumurta kümeleri, DNA ekstraksiyonu yapılmaya kadar -80°C'de tutulmuştur.

4.3.3 Genomik DNA ekstraksiyonu

Derin dondurucuda muhafaza edilen kan örnekleri, oda ısısında çözdürülmüş ve homojen hale geçmesi için 10-15 saniye (sn.) vortekslelendikten sonra DNA ekstraksiyonuna geçilmiştir. DNA ekstraksiyonu, ticari DNA izolasyon kiti (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) kullanılarak kit protokolüne göre yapılmıştır.

Yumurta kümeleri sıvı azot yardımıyla ependorf tüplerde iyice ezildikten sonra 180 µl digestion buffer ve 20 µl Proteinaz K ilave edilerek 56°C'yi sağlayan benmaride bir gece bekletilmiştir. DNA ekstraksiyonu, yukarıda belirtilen DNA izolasyon kiti ile gerçekleştirilmiştir.

Genomik DNA izolasyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla örnekler nanodrop spektrofotometre (NanoDrop1 ND-2000 UV/vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, USA) kullanılarak µl'deki DNA oranları (ng/mL) belirlenmiştir. DNA ekstraksiyonunda kontrol olarak laboratuvar stoklarımızda mevcut olan piroplasm pozitif (*T. ovis*, *B. ovis*) kan örnekleri kullanılmıştır.

4.3.4 Referans genomik DNA izolatları

Pozitif kontrol DNA örneği olarak, *T. ovis* (EF092452), *T. annulata* (AY508463), *Theileria* sp. MK (EU262483), *Theileria* sp. OT3 (EF092455), *B. ovis* (EF092454) ve *B. crassa* (KF034782) için daha önce laboratuvarımızda izole edilen ve sekans analizi ile teyit edilmiş genomik DNA'lar kullanılmıştır. *T. luwenshuni* ve *T. uilenbergi* Dr. Younquan Li (Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xujiaping 11, Lanzhou, Gansu, Republic of China), *T. lestoquardi* Dr. Jabbar Ahmed (Immunology and

Cell Biology, Research Center, Borstel Germany), *Theileria* sp. OT1 ve *B. motasi* ise Dr. Sonia Almeria de la Merced (Department of Parasitology, Veterinary School, Autonomous University of Barcelona, Spain)'den temin edilmiştir.

Negatif kontrol DNA örneği elde etmek için, 3 aylık kuzudan kan alınmış ve bu kandan yukarıda belirtildiği şekilde DNA ekstrakte edilmiştir. Bu DNA, RLB-F2/RLB-R2 primerleri kullanılarak amplifikasyona tabi tutulmuştur. Reaksiyon sonucunda, *Theileria* ve *Babesia* türlerinin varlığını gösterecek herhangi bir amplifikasyon ürünü oluşmamıştır. Ayrıca bu kandan hazırlanan sürme froti, piroplasm formları yönünden kontrol edilmiştir. Böylece bu örneğin, *Theileria* ve *Babesia* parazitleri yönünden ari olduğu kabul edilmiş ve bu çalışma süresince gerek DNA ekstraksiyonunda ve gerekse PZR ve RLB testinde negatif kontrol DNA örneği olarak kullanılmıştır.

4.3.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

DNA amplifikasyonu, Touch Down Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Touch Down PZR) olarak Thermo Hybaid PX2 (Hybaid) marka cihaz kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon, toplam 25 µl hacimde gerçekleştirilmiş ve her reaksiyonunda, pozitif ve negatif kontrol DNA örnekleri kullanılmıştır. PZR şartları Tablo 3, reaksiyon içeriği ise Tablo 4'de verilmiştir. Amplifikasyon sonunda elde edilen ürünlerin bir kısmı (5 µl) agaroz jelde elektroforoze tabi tutulmuş ve ultraviyole transilluminatörde görüntülenip değerlendirilmiştir. Geri kalan PZR ürünü (20 µl) ise RLB testinde kullanılmak üzere +4°C'de tutulmuştur.

Tablo 3: DNA amplifikasyonunda kullanılan Touch Down PZR ısı şartları

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

Tablo 4: Touch Down PZR reaksiyonu içeriği

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

Final konsantrasyon: 25 µl

4.3.6 PZR ürünlerinin görüntülenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonunda elde edilen ürünlerin bir kısmı, agaroz jel elektroforeze tabi tutulmuş; %1,6'lık agarose jel hazırlandıktan sonra, 5 µl PCR ürünü, 2,5 µl yükleme solüsyonu (Loading Dye) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez işlemi Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tampon solüsyonu kullanılarak jel tankında 90 voltta bir saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra jel, ethidium bromide (10mg/ml) ile 30 dk. boyandıktan sonra, UV (Ultraviole) transillüminatörde spesifik bantların varlığı yönünden incelenmiştir.

4.3.7 RLB membranının hazırlanması

Biodyne-C membran (PALL Gelman Laboratory, A.B.D.) üzerine, PZR ürünleri ile hibridize olacak oligonükleotidlerin bağlanması Gubbels ve ark. (160) ile Georges ve ark. (161)'nin bildirdiği şekilde yapılmıştır. Buna göre, Biodyne C membran oda ısısında 10 dk., 10 ml %16 EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) ile aktive edildikten sonra, distile su ile yıkanarak MN45 Miniblotter (Isogen Life Sciences, Hollanda)'a yerleştirilmiştir. Problar, membrana bağlanmak üzere 500 mM NaHCO₃ (pH: 8,4) ile 50-1200 pmol/150µl olacak şekilde sulandırılmıştır. Membran üzerindeki kalıntı sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra, ilk ve son kanala 2X SSPE ile 1/100 oranında sulandırılmış çini mürekkebi, diğer kanallara ise 500 mM NaHCO₃ kullanılarak sulandırılan problar yüklenmiştir. Membran, oda ısısında 10 dk. inkübe edildikten sonra kanallardaki sıvı aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Miniblotter'dan çıkarılan membran, 100 mM NaOH ile 10dk. inaktive edilmiş ve

2X SSPE / %0,15 SDS ile 60°C'de 5 dk. yıkanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

4.3.8 Reverse Line Blotting

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinden 20 µl alınarak, 2X SSPE / %0,1 SDS ile 150 µl'ye tamamlanmış ve Thermal Cycler cihazında 100°C' de 10 dk. tutularak denatüre edilmiştir. PZR ürünleri buz raketlerinde şok soğutmaya tabi tutularak DNA iplikçiklerinin birleşmesi engellenmiştir. 20 mM EDTA içinde +4°C muhafaza edilen membran, 2X SSPE / %0,15 SDS ile oda ısısında 5 dk. yıkanmış ve Miniblotter'a yerleştirilmiştir. Membrandaki sıvılar aspire edildikten sonra kanallara 150 µl PZR ürünü yüklenmiş ve düz bir zeminde 42°C'de bir saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben, kanallardaki sıvı aspire edilmiş ve membran iki kere 2X SSPE / %0,5 SDS ile 52°C'de 10 dk. yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra 2X SSPE/ %0,5 SDS ile 1: 4000 oranında sulandırılmış 10 ml peroksidaz ile işaretlenmiş streptavidin-POD Konjugat (Roche, Almanya) solüsyonunda hafif çalkalanarak 42°C'de 30 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben membran, 2X SSPE / %0,5 SDS ile 2 defa 42°C'de 10 dk. ve 2X SSPE ile 2 defa oda ısısında 5 dk. yıkanmıştır. Membran, 10 ml ECL sıvısında (Amersham, İngiltere) 1 dk. inkübe edildikten sonra, sert bir zemine alınarak, üzeri asetatla örtülmüş ve hava kabarcıkları uzaklaştırıldıktan sonra, karanlık ortamda Kodak Biomax Light Film (A.B.D.) altında, sinyallerin kuvvetine göre 30 sn - 30 dk. bekletilmiş ve banyo işlemine geçilmiştir. Filmler üzerinde prob ve PZR sıralarının kesiştiği yerlerde oluşan siyah lekeler, pozitif kabul edilmiştir.

Görüntüleme işlemi tamamlandıktan sonra membran, %1 SDS ile 80-90°C'de 30 dk. İki kez yıkanmıştır. Daha sonra 20mM EDTA ile 15 dk. oda

ısısında yıkama işlemi tekrar edilmiş ve tekrar kullanılmak üzere 20mM EDTA içinde +4°C’de saklanmıştır.

4.3.9 RLB’de kullanılan primer ve problar

Koyun ve keçilerden toplanan kan ile yumurta kümelerinden ekstrakte edilen DNA örnekleri, bütün *Theileria* ve *Babesia* türlerinin varlığı yönünden PZR’de amplifikasyona tabi tutulmuştur. *Theileria/Babesia* türlerinin amplifikasyonunda primer olarak bu parazitlerin 18S rRNA geninin V4 değişken bölgesini çoğaltan RLB-F2 (5’GACACAGGGAGGTAGTGACAAG-3’) ve RLB-R2 (Biotin-5’-CTAAGAATTTTCACCTCTGACAGT-3’) kullanılmıştır (161). Gerek RLBF2 ve RLBR2 primerleri ve gerekse RLB testinde kullanılan problar, 5’ – uçlarında amino grubu N – (Trifluoracetamidohexyl – eyanoethyl, N, N, - diisopropyl phosoramidite (TFA)-C6 aminolinker) içerecek şekilde “The Midland Certified Reagent (Co. Inc. A.B.D.) firmasına sentezlettirilmiştir. Liyofilize halde gönderilen RLB primerler, DNaz ve RNaz içermeyen bi-distile steril su ile 100 pmol/μl konsantrasyonda sulandırılarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, membrana Catchall (*Theileria* + *Babesia*) ve soy spesifik (*Theileria* spp. ve *Babesia* spp.) probların yanı sıra bugüne kadar koyun ve keçilerde tanımlanan *Theileria* ve *Babesia* türleri ile bazı genotiplere özgü toplam 15 farklı prob bağlanmıştır. İlk defa bu çalışmada kullanılan *Babesia* sp. probu hariç, diğer problar daha önce yapılan araştırmalarda kullanılmışlardır (16, 63, 64, 160, 175). Bu çalışmada, *Babesia* catcall probuna sinyal veren ancak diğer problara karşı sinyal alınamayan örnekler ait 18S rRNA geninin yaklaşık 1500 baz çifti uzunluğundaki bir bölgenin nükleotid dizilimi belirlenerek yeni bir prob dizayn edilmiştir. Prob dizaynı için MAFT programı kullanılmıştır. RLB testinde

kullanılan probalar ile bunlara ait nükleotid dizilimleri ve konsantrasyonları Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5: RLB’de kullanılan probalar ile nükleotid dizilimleri ve konsantrasyonları.

Prob	Dizilim (5’-3’)	pmol/150µl	Kaynak
<i>Theileria/Babesia</i> Catchall	TAATGGTTAATAGGA(AG)C(AG)GTTG	200	160
<i>Theileria</i> spp.	TGATGGGAATTTAAACC(CT)CTTCCA	200	63
<i>T. ovis</i>	TTTTGCTCCTTTACGAGTCTTTGC	400	63
<i>T. lestoquardi</i>	ATTGCTTGTGTCCCTCCG	400	16
<i>T. uilenbergi</i>	TGCATTTTCCGAGTGTTACT	400	16
<i>T. luwenshuni</i>	TCGGATGATACTTGTATTATC	400	16
<i>Theileria</i> sp. OT1	ATCTTCTTTTTGATGAGTTGGTGT	400	63
<i>Theileria</i> sp. OT3	ATTTTCTCTTTTTATATGAGTTTT	400	63
<i>Theileria</i> sp. MK	CATTGTTTCTTCTCATGTC	400	64
<i>T. annulata</i>	CCTCTGGGGTCTGTGCA	400	160
<i>Babesia</i> Catchall 1	ATTAGAGTGTTC AAGCAGAC	200	175
<i>Babesia</i> Catchall 2	ACTAGAGTGTTC AAACAGGC	200	175
<i>B. ovis</i>	GCGCGCGGCCTTTGCGTTTACT	400	63
<i>B. motasi</i>	ATTGGAGTATTGCGCTTGCTTTTT	400	63
<i>B. crassa</i>	TTATGGCCCGTTGGCTTAT	400	16
<i>Babesia</i> sp.	TGCCGTGAATCGACATTCGTC	400	Bu çalışma

4.3.10 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Bu çalışmada RLB membranına hem *T. lestoquardi* hem de *T. annulata* probu bağlanmıştır. Bu türlerin 18S rRNA geninin V4 değişken bölgesinde nükleotid farklılığı olmadığından, RLB yöntemi ile tür düzeyinde teşhis yapılamamaktadır. Dolayısı ile RLB’de her iki proba karşı sinyal alınan örneklerin teşhisinde PZR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Bunun için, DNA örnekleri Thei F1/ Thei R1 ve Thei F2/ Thei R2 primerleri kullanılarak 18S rRNA gen bölgesi nested PZR ile amplifiye edilmiştir. Amplifikasyonda kullanılan primerler ile bunların nükleotid dizilimleri ve PZR şartları Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6: RFLP işelminde kullanılan primerler ve PZR şartları.

Primer	Dizilim (5'-3')	PZR Şartları	Kaynak
Thei F1	AAC CTG GTT GAT CCT GCC AG	94°C 5dk, 94°C- 50°C-72°C 30 sn, 72°C 5 dk	96
Thei R1	AAA CCT TGT TAC GAC TTC TC		
Thei F2	TGA TGT TCG TTT YTA CAT GG	94°C 5dk, 94°C- 52°C-72°C 30 sn, 72°C 5 dk	
Thei R2	CTA GGC ATT CCT CGT TCA CG		

Nested PZR ürünlerinin restriksiyonunda Hpa II enzimi kullanılmıştır. RFLP karışımı, 37°C'de 2 saat süreyle sıcak su banyosunda tutulduktan sonra %2'lik agaroz jelde 1 saat elektroforeze tabi tutulmuş ve UV transilliminatorde restriksiyon profilleri izlenmiştir. Hpa II enzimi *T. lestoquardi*'yi 5 (900, 278, 106, 94, 39 bp), *T. annulata* ve *T. ovis*'i ise 4 bölgeden (*T. annulata*, 1178, 106, 94, 39 bp; *T. ovis*, 856, 326, 204, 39 bp) kesmektedir. RFLP analizinin gerçekleştirilmesinde kullanılan restriksiyon enzimi ve karışımı oluşturan ürün miktarları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7: RFLP analizinde kullanılan restriksiyon enzimi ve karışımı oluşturan ürün miktarları.

Malzeme	Miktar(µl)
Hpa II restriksiyon enzim	1
10X buffer	2
Ultrasafsu	7
PZR ürünü	10
Toplam	20

4.3.11 DNA dizilimi, genetik karşılaştırmalar ve filogenetik analiz

Çalışmada PZR ve RLB sonuçları doğrulamak amacıyla koyun ve keçilerde tespit edilen *T. annulata*, *T. ovis* ve *B. ovis* türleri ile *Babesia* sp. genotipine ait toplam 10 izolatin nükleotit sekansları belirlenerek, GenBank'ta mevcut sekanslar ile genetik karşılaştırmaları yapılmıştır. Dizi analizinde, *Theileria* ve *Babesia* türlerinin identifikasyonunda yaygın olarak kullanılan 18S

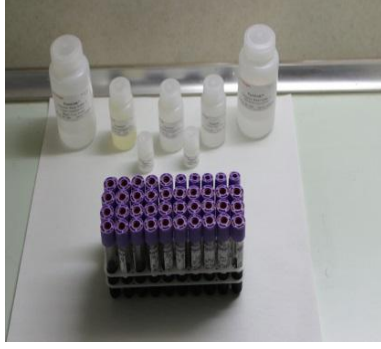
rRNA geni hedef alınmıştır. İlk basmakta izolatların, RLB-F2/RLB-R2 primerleri ile hedef gen bölgesi amplifiye edilmiştir. Elde edilen ampliconlar, %1,5'lik agaroz jelde görüntüledikten sonra jel pürifikasyon kiti (QIAquick® Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) ile pürifiye edilerek RLB-F2 primeri ile tek yönlü sekanslanmış ve 18S rRNA genindeki V4 değişken bölgeye ait yaklaşık 350 bp uzunluğunda sekanslar elde edilmiştir.

Bu çalışmada tespit edilen *Babesia* sp. genotipin bugüne kadar tanımlanan *Babesia* tür ve genotipleri arasındaki filogenetik ilişkisinin anlaşılabilmesi için 18S rRNA geninde çok daha uzun bir bölgenin dizi analizinin ortaya konması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bunun için *Babesia* sp. genotipine ait iki, *T. annulata*'ya ait bir izolat 18S rRNA gen bölgesini hedef alan Nbab1F/Nbab1R ve BT18F2/BT18R2 primerleri ile nested PZR'de amplifiye edilmiş ve yaklaşık 1466 bp uzunluğunda amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. Nested PZR sonucunda elde edilen ampliconlar pürifiye edildikten sonra BT18F2/BT18R2 primerleri ile çift yönlü sekanslanmış ve *Babesia* sp. genotipine ait 1400 ve 1413 bp, *T. annulata*'ya ait 1433 bp uzunluğunda sekanslar elde edilmiştir. Bütün *Theileria* türlerini çoğaltan 989/990 primerleri kullanılarak *T. ovis* izolatına ait yaklaşık 1098 bp uzunluğunda bir bölge amplifiye edilmiştir. Bu amplicon, aynı primerler ile çift yönlü sekanslanmış ve 919 bp uzunluğunda bir sekans elde edilmiştir. Elde edilen sekanslar, EMBL/GenBank veri tabanına kayıt edilmiştir. Bu sekansların elde edilmesi için yapılan nested PZR ve PZR şartları ile primerlere ait nükleotid dizilimleri Tablo 8'de verilmiştir.

Çoklu sekans hizalama analizleri ve buna bağlı olarak nükleotid sıraları arasındaki yüzde benzerlik oranlarının belirlenmesi, MAFFT programı ile gerçekleştirilmiştir (176). Bu çalışmada tanımlanan *Babesia* sp. izolatu, şimdiye kadar dünyanın değişik bölgelerinde koyun ve keçilerde tanımlanan ve GenBank'ta kayıtlı *Babesia* sekansları ile “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) web sayfasındaki BLAST programı kullanılarak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) karşılaştırılmıştır. Filogenetik yapıların belirlenmesinde Maximum Likelihood (ML) analizleri uygulanmıştır. ML analizleri Mega 6.0.6 yazılımı üzerinden gerçekleştirilmiştir. ML analizlerinde sekans evrimi için en uygun modelin belirlenmesinde jModel Test 2 kullanılmış olup en düşük Akaike Bilgi Kriteri (AIC) değerine sahip General Time Reversible+Gamma Distribution modeli filogenetik ağaç oluşturulmasında uygulanmıştır. Node güvenilirliğinin belirlenmesinde bootstrap replikasyon değeri 1000 alınmıştır (177, 178).

Tablo 8: Sekansların elde edilmesi için yapılan nested PZR ve PZR şartları ile primerlere ait nükleotid dizilimleri.

Primer	Dizilim (5'-3')	PZR Şartları	Kaynak	Ürün Büyüklüğü
Nbab1F	AAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCTTTT	94°C 5dk, 94°C 30sn- 65°C-72°C 1dk, 72°C 30 dk	70	1600 bç
Nbab1R	CCTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTTAC			
BT18F2	TTGTAGGGCTAATACAYGYTCG	94°C 4dk, 94°C 30sn- 52°C 20sn-72°C	179	1466 bç
BT18R2	CACGGTCCGAATAATTCACC	30sn, 72°C 7dk		
989	AGTTTCTGACCTATCAG	94°C 4dk, 94°C 1dk- 60°C 1dk-72°C 1dk,	180	1098 bç
990	TTGCCTTAAACTTCCTTG	72°C 7dk		



Şekil 2: Laboratuvar görüntüleri.

4.4 Çalışmada kullanılan malzemeler

4.4.1 Mikroskopide kullanılan solüsyonlar

4.4.1.1 Metanol (Merck, Germany)

%96-100 saf methanol frotide tespit amacıyla kullanıldı.

4.4.1.2 Giemsa stok solüsyonu (Merck, Germany)

Stok halindeki Giemsa'dan %5 olacak şekilde distile su ile Giemsa solüsyonu hazırlandı.

4.4.1.3 İmmersiyon yağı

100'lük objektifte kullanıldı.

4.4.2 Jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar

4.4.2.1 50 X TAE buffer

242 gr Tris- Base

100 ml 0,5 M EDTA pH: 8.0

57,1 ml Glasiyel asetik asit

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

4.4.2.2 1X TAE Buffer

50X TAE stok solüsyondan 50 kat sulandırılarak hazırlanır.

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

1/6 oranında sulandırıldı ve 5 µl kullanıldı.

4.4.2.4 Loading dye solüsyonu (6X; MBI Fermentas, Lithuania)

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

4.4.2.5 Ethidium bromide (AppliChem GmbH, Dramstadt, Germany)

10mg/µl olacak şekilde sulandırıldı. Agaroz jeli boyama için 100 ml jele 6µl Ethidium Bromide solüsyonu katıldı.

4.4.3 PZR için gerekli solüsyonlar

4.4.3.1 10 X PCR buffer (MBI Fermentas, Lithuania; Geneall, Korea)

750 mM Tris-HCl (pH 8,8; 25 oC)

200 mM (NH₄)₂SO₄

%0,1 Tween 20

Her PZR numunesi için 5 µl kullanıldı.

4.4.3.2 MgCl₂ (25 mM; Geneall, Korea)

Her PZR numunesi için 5 µl kullanıldı.

4.4.3.3 dNTP set (100 mM'lık miks; dATP + dTTP + dCTP + dGTP; MBI Fermentas, Lithuania)

Steril distile su kullanılarak 1,25 mM yoğunlukta hazırlandı.

4.4.3.4 Taq DNA polymerase enzimi (500 U; Geneall, Korea; MBI Fermentas, Lithuania)

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

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

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

4.4.4. RLB'de kullanılan solüsyonlar

4.4.4.1 500 mM NaHCO₃ (pH: 8.4) (NaHCO₃, Merck)

21,0025 gr NaHCO₃ 500 ml distile suda çözülür.

10 M NaOH yardımıyla pH: 8.4 olacak şekilde ayarlanır ve oda sıcaklığında 1 yıl süre ile saklanabilir.

4.4.4.2 %16 EDAC (1-etil-3 dimetilaminopropil karbodimin) (EDAC, Sigma)

1,6 gr EDAC, distile su ile 10 ml'ye tamamlanır. Kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlanır.

4.4.4.3 %10'luk SDS (oda ısısında 1 ay muhafaza edilir)

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

4.4.4.4 20X SSPE

175,3 gr NaCl,

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

7,4 gr EDTA

800 ml distile su içinde çözdürülür.

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

4.4.4.5 2X SSPE

20X SSPE'den 10 kat sulandırılarak hazırlanır.

4.4.4.6 2X SSPE / % 0,1 SDS

100 ml 20X SSPE

10 ml %10 SDS

890 ml distile su içerisinde çözdürülür.

4.4.4.7 2X SSPE / % 0,15 SDS

100 ml 20X SSPE

15 ml %10 SDS

885 ml distile su içerisinde çözdürülür.

4.4.4.8 2X SSPE / % 0,5 SDS

100 ml 20X SSPE

50 ml %10 SDS

850 ml distile su içerisinde çözdürülür.

4.4.4.9 %1 SDS

%10'luk SDS stoğundan 10 katı sulandırılarak taze hazırlanır.

4.4.4.10 0,1 M EDTA

37,224 gr EDTA 1 L distile suda çözdürülür.

4.4.4.11 20 mM EDTA

0,1 M EDTA stoğundan 5 kat sulandırılarak hazırlanır.

4.4.4.12 Streptavidin POD conjugate

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

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

4.4.5 Agaroz Jel Hazırlama

100 ml 1X TAE Buffer'a 1gr Agarose (İnvitrogen) eklenir ve mikrodalga fırında 1dk boyunca kaynatılır. Soğutulduktan sonra 6μl ethidium bromide eklenir ve jel sehpasına dikkatlice dökülür.

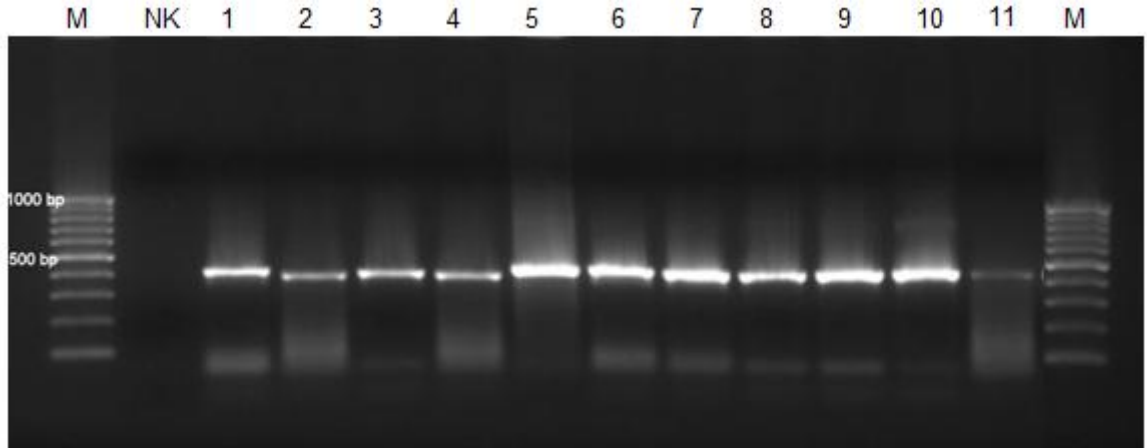
4.4.6 İstatistiksel Analiz

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

5. BULGULAR

5.1 PZR ve RLB'nin optimizasyonu ve spesifitesi

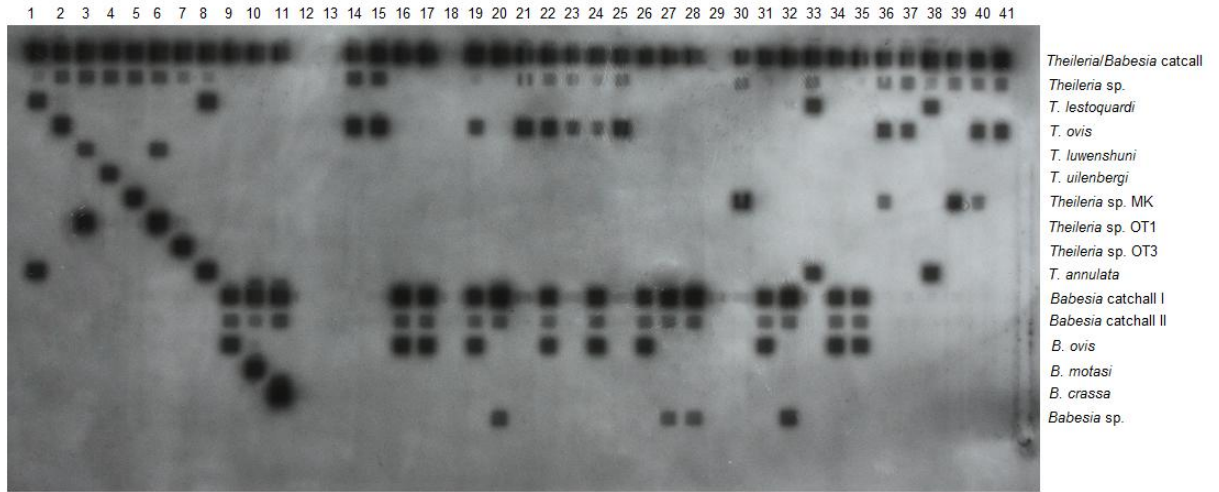
Saha örneklerinin incelenmesine geçilmeden önce PZR ve RLB testi optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında, laboratuvarımızda mevcut *T. ovis*, *T. annulata*, *Theileria* sp. MK, *Theileria* sp. OT3, *B. ovis* ve *B. crassa* ile çeşitli laboratuvarlardan temin edilen *T. lestoquardi*, *T. luwenshuni*, *T. uilenbergi*, *Theileria* sp. OT1 ve *B. motasi* DNA örnekleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. RLB-F2 ve RLB-R2 primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi, beklenildiği gibi 360 ile 430 baz çifti uzunluğunda amplifikasyon ürünü elde edildiğini göstermiştir (Şekil 3).



Şekil 3: RLB-F2/RLB-R2 primerleri ile elde edilen *Theileria* ve *Babesia* tür ve gonotiplerine ait amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüsü. M, 100 bç'lik marker; NK, PZR negatif kontrol; 1-11, PZR pozitif kontrol (1, *T. lestoquardi*; 2, *T. ovis*; 3, *T. luwenshuni*; 4, *T. uilenbergi*; 5, *Theileria* sp. MK; 6, *Theileria* sp. OT1; 7, *Theileria* sp. OT3; 8, *T. annulata*; 9, *B. ovis*; 10, *B. motasi*; 11, *B. crassa*).

Gerek pozitif kontrol ve gerekse saha örneklerine ait DNA'lerden elde edilen PZR ürünleri, *Theileria* ve *Babesia* tür ve genotiplerine spesifik problemlerin bağlandığı membranda hibridizasyona tabi tutulduğunda, pozitif kontrol DNA'lerden elde edilen PZR ürünlerinin hepsi prob karşılıkları ile reaksiyon vermiştir (Şekil 4, sıra 1-11). Yine saha örneklerinden elde edilen PZR ürünlerinin büyük bir kısmı, membrandaki prob karşılıkları ile reaksiyon vermiştir (Şekil 4, sıra 14-17, 19, 21-26, 30, 31, 33-41). Ancak bazı örnekler sadece *Theileria/Babesia* Catchall ve *Babesia* Catchall 1 ve 2 problemleri ile sinyal oluşturmuştur (Şekil 4, sıra 20, 27, 28, 32). Bu durum, bölgede farklı bir *Babesia* türü yada genotipin varlığını göstermesi açısından önemli bulunmuştur.

RLB testinde, beklenildiği gibi *T. annulata* ile *T. lestoquardi* arasında çapraz reaksiyon gözlenmiştir (Şekil 4, sıra 1 ve 8). Yine bu çalışmada, *T. luwenshuni* ile *Theileria* sp. OT1 arasında da çapraz reaksiyon gözlenmiştir (Şekil 4, sıra 3 ve 6). Diğer *Theileria* ve *Babesia* türleri arasında çapraz reaksiyon görülmemiştir. Bazı saha örneklerinde miks enfeksiyonlar (Şekil 4, sıra 36, 40, *T. ovis* + *Theileria* sp. MK; sıra 19, 22, 24, *T. ovis* + *B. ovis*) tespit edilmiştir.



Şekil 4: Pozitif kontrol ve saha örneklerine ait PZR ürünlerinin RLB görüntüsü. Soldan sağa prob sıraları, yukarıdan aşağıya örnek sıraları. 1-11, pozitif kontrol (1, *T. lestoquardi*; 2, *T. ovis*; 3, *T. luwenshuni*; 4, *T. uilenbergi*; 5, *Theileria* sp. MK; 6, *Theileria* sp. OT1; 7, *Theileria* sp. OT3; 8, *T. annulata*; 9, *B. ovis*; 10, *B. motasi*; 11, *B. crassa*); 14-17, 19-28, 30-41, saha örnekleri (14, 15, 21, 23, 25, 37, 41 *T. ovis*; 30, 39 *Theileria* sp. MK; 33, 38 *T. annulata*; 16, 17, 26, 31, 34, 35 *B. ovis*; 20, 27, 28, 32 *Babesia* sp.; 19, 22, 24 *T. ovis* + *B. ovis*; 36, 40 *T. ovis* + *Theileria* sp. MK; 12, 13 negatif kontrol (enfekte olmayan koyun DNA'sı); 18, 29 buffer.

5.2 DNA dizileme ve genetik karşılaştırmalar

Çalışmada koyun ve keçilerde identifiye edilen *T. ovis*, *T. annulata* ve *B. ovis* türleri ile sadece Catchall problemler ile sinyal oluşturan izolatu temsilen seçilen örneklerin parsiyel 18S rRNA nükleotid dizilimleri belirlenmiştir. *T. ovis*, *T. annulata* ve *B. ovis*'e ait birer, Catchall problemler ile sinyal oluşturan örneklere ait iki izolat GenBank'a kayıt edilmiş ve KU714605 (*Babesia* sp.), KU714606

(*Babesia* sp.), KU714607 (*T. annulata*), KU714608 (*T. ovis*) ve KU714609 (*B. ovis*) aksesyon numaraları ile yayınlanmıştır.

BLAST analizine bakıldığında, bu çalışmada sekans analizleriyle karakterizasyonu yapılan *T. annulata* (KU714607), *T. ovis* (KU714608) ve *B. ovis* (KU714609) izolatlarının yeni birer haplotip oldukları ve daha önce Türkiye’de identifiye edilen ve GenBank’ta mevcut *T. annulata* (AY508471), *T. ovis* (AY508461) ve *B. ovis* (KT851445) sekansları ile %98,2-99,9 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada Catchall problara sinyal veren izolata ait sekanslar ile (KU714605 ve KU714606) BLAST analizinde bunlara en yakın benzerlik gösteren diğer *Babesia* tür (*Babesia odocoilei*, *Babesia* sp. EU1, *B. divergens*, *B. ovis*, *B. motasi*, *B. crassa*) ve genotiplere (*Babesia* sp. Lintan, *Babesia* sp. Madang, *Babesia* sp. Tianzhu, *Babesia* sp. Ningxian, *Babesia* sp. Hebei, *Babesia* sp. Liaoning, *Babesia* sp. Xinjiang) ait sekanslar arasında MAFFT programı kullanılarak ayrıntılı yüzde benzerlik analizi yapılmış ve sonuçlar Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9: *Babesia* sp. genotipi ile diğer *Babesia* tür ve genotipleri arasındaki yüzde benzerlik analizi.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Babesia</i> sp. V5 KU714605*	1	100.00	99.64	97.66	97.45	96.96	93.53	93.22	93.59	93.44	93.02	93.67	93.48	91.17	93.27	90.82	91.45
<i>Babesia</i> sp. V8 KU714606*	2		100.00	97.57	97.28	96.93	93.32	93.08	93.45	93.30	92.81	93.46	93.49	91.01	93.06	90.96	91.51
<i>B. odocoilei</i> KC460321	3			100.00	98.50	98.28	93.30	92.40	93.23	93.10	92.35	93.30	93.65	88.27	93.65	91.03	91.06
<i>Babesia</i> sp. EU1 GQ888709	4				100.00	97.96	93.82	92.91	93.69	93.57	92.81	93.82	93.90	88.25	94.19	90.55	90.37
<i>B. divergens</i> KP745627	5					100.00	93.16	92.10	92.88	92.75	91.99	92.82	93.24	89.00	93.18	90.98	90.84
<i>B. motasi</i> AY260179	6						100.00	97.44	98.21	98.15	97.03	97.86	96.11	92.23	94.54	91.22	89.86
<i>Babesia</i> sp. Lintan AY260181	7							100.00	99.17	99.17	98.75	97.26	95.11	92.15	93.94	90.44	89.39
<i>Babesia</i> sp. Madang DQ159071	8								100.00	99.88	98.10	98.09	95.70	92.40	94.76	91.02	89.58
<i>Babesia</i> sp. Tianzhu DQ159072	9									100.00	98.04	97.97	95.58	92.34	94.70	90.96	89.58
<i>Babesia</i> sp. Ningxian AY260182	10										100.00	97.92	95.36	93.38	93.77	90.58	89.20
<i>Babesia</i> sp. Hebei DQ159074	11											100.00	96.24	93.43	94.35	91.09	89.53
<i>B. crassa</i> AY260176	12												100.00	90.52	94.01	91.52	89.94
<i>Babesia</i> sp. Liaoning DQ159075	13													100.00	88.81	87.48	86.48
<i>Babesia</i> sp. Xinjiang DQ159073	14														100.00	92.93	89.82
<i>B. ovis</i> AY998123	15															100.00	87.81
<i>B. lengau</i> GQ411417	16																100.00

Tablo 9'dan anlaşılacağı üzere KU714605 ve KU714606 sekanslarının, *B. ovis*, *B. motasi* ve *B. crassa* türlerine %90-93; *Babesia* sp. Lintan, *Babesia* sp. Madang, *Babesia* sp. Tianzhu, *Babesia* sp. Ningxian, *Babesia* sp. Hebei, *Babesia* sp. Liaoning, *Babesia* sp. Xinjiang genotiplerine %91-93 ve ilk defa çita ve kedilerde tanımlanan, daha sonra koyunlarda da tespit edilen *B. lengau* türüne ise %91 oranında benzer olduğu görülmüştür. Diğer taraftan bu sekansların, geyiklerde klinik enfeksiyona neden olan *Babesia odocoilei* (*B. odocoilei*), geyik ve insanlarda tanımlanan *Babesia* sp. EU1 ve sığır ve insanlar için patojen olduğu bilinen *B. divergens*'e %96-97 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, ilk defa bu çalışmada identifiye edilen söz konusu *Babesia* izolatının yeni bir genotip olabileceğini göstermiş ve bu yeni genotip *Babesia* sp. olarak adlandırılmıştır.

5.3 Yeni prob dizaynı

Bu çalışmada identifiye edilen *Babesia* sp. izolatına ait sekanslar (*Babesia* sp. V5 KU714605 ve *Babesia* sp. V8 KU714606) ile GenBank'ta kayıtlı *B. crassa* (AY998123), *B. motasi* (AY533147) ve *B. ovis* (AY998123) sekansları kullanılarak çoklu hizalamalar yapılmıştır. MAFFT programı ile yapılan çoklu sıralama Şekil 5'te verilmiştir.

```

ctcaccagag taacaattgg agggcaagtc tgggtccagc agccgcggta 365 Babesia sp. V5 (KU714605)
ctcaccagag taacaattgg agggcaagtc tgggtccagc agccgcggta 351 Babesia sp. V8 (KU714606)
ctcgccagag taccaattgg agggcaagtc tgggtccagc agccgcggta 541 B. crassa (AY998123)
ctcgccagag taccaattgg agggcaagtc tgggtccagc agccgcggta 535 B. motasi (AY533147)
ctcgccagag taccaattgg agggcaagtc tgggtccagc agccgcggta 485 B. ovis (AY998123)
*** **

attccagctc caatagcgtt tattaaactt gttgcagtta aaaagctcgt 415 Babesia sp. V5 (KU714605)
attccagctc caatagcgtt tattaaactt gttgcagtta aaaagctcgt 401 Babesia sp. V8 (KU714606)
attccagctc caatagcgtt tattaaactt gttgcagtta aaaagctcgt 591 B. crassa (AY260176)
attccagctc caatagcgtt tattaaactt gttgcagtta aaaagctcgt 585 B. motasi (AY533147)
attccagctc caatagcgtt tattaaactt gttgcagtta aaaagctcgt 535 B. ovis (AY998123)
*****

agttgaattt cagcgttggc gtgaatcgac attcgtcgtt tatcggtttc 465 Babesia sp. V5 (KU714605)
agttgaattt cagcgttggc gtgaatcgac attcgtcgtt tatcggcttc 451 Babesia sp. V8 (KU714606)
agttgaactt cagccatt-- ----- ----gcgccg tgcgcaagat 625 B. crassa (AY998123)
agttgaattt gagcttgc-- ----- ----gcgatt cgttatttgg 619 B. motasi (AY533147)
agttgaactt cggccttg-- ----- ----cgcgtc ctgcgggtct 569 B. ovis (AY998123)
***** **

gcttttggga tttatc---- --ccttttta ctttgagaaa attagagtgt 509 Babesia sp. V5 (KU714605)
gcttttggga tttatc---- --ccttttta ctttgagaaa attagagtgt 495 Babesia sp. V8 (KU714606)
tgcgttatgg cccgttggct tatcttttta ctttgagaaa attagagtgt 675 B. crassa (AY998123)
agtattgcgc ttgctt---- --tttggtta ctttgagaaa attagagtgt 663 B. motasi (AY533147)
gcgcgcggcc t----- --ttgcgtta ctttgagaaa attanagtgt 608 B. ovis (AY998123)
***

ttcaagcaga cttttgtcct gaatacttca gcatggaata atagagttagg 559 Babesia sp. V5 (KU714605)
ttcaagcaga cttttgtcct gaatacttca gcatggaata atagagttagg 545 Babesia sp. V8 (KU714606)
ttcaagcaga cttttgtcct gaatacttca gcatggaata atagagttagg 725 B. crassa (AY998123)
ttcaagcaga cttttgtcct gaatacttca gcatggaata atagagttagg 713 B. motasi (AY533147)
ttcaagcagg ctttcgcctg gaatacttga ncatggaata actgggcagg 658 B. ovis (AY998123)
*****

```

Şekil 5: *Babesia* sp. V5, *Babesia* sp. V8, *B. crassa*, *B. motasi* ve *B. ovis* sekanslarına ait Multiple Alignment sonuçları

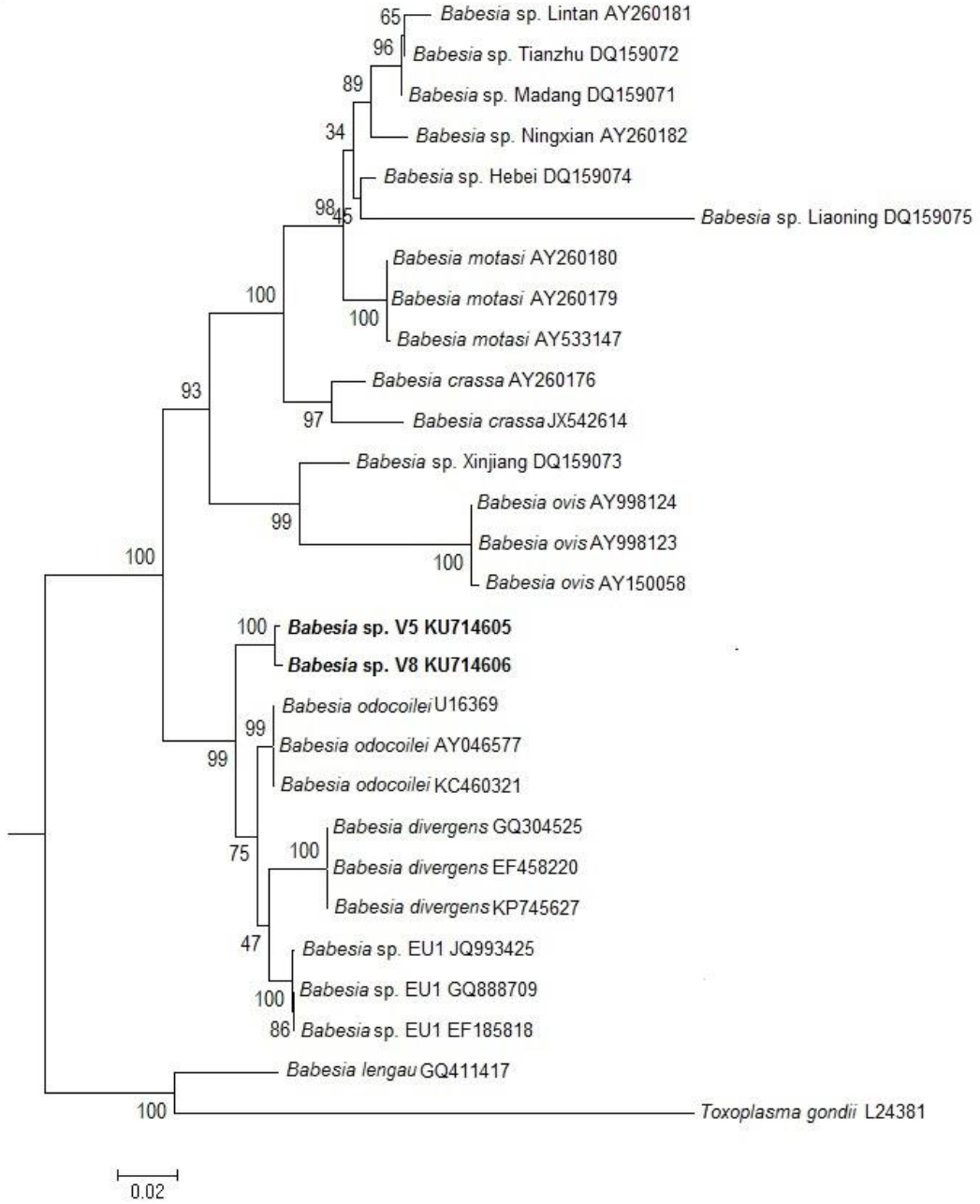
Şekil 5'ten anlaşılacağı üzere, *Babesia* sp. V5 ve *Babesia* sp. V8 izolatlarına ait sekansların *Babesia* türlerinin 18S rRNA geninin V4 değişken bölgesindeki nükleotid diziliminin, *B. crassa*, *B. motasi* ve *B. ovis*'in nükleotid dizilimlerinden oldukça farklı olduğu görülmüştür. Bu bölgeden seçilecek probun *Babesia* sp. V5 ve *Babesia* sp. V8 izolatlarına özgü olacağı düşünülerek nükleotid dizilimi TGCCGTGAATCGACATTCGTC'den oluşan ve *Babesia* sp. olarak adlandırılan yeni bir prob dizayn edilmiştir. Bu probun, koyun ve keçilerde enfeksiyona neden olan *Theileria* ve *Babesia* tür ve genotiplerine ait PZR ürünleri ile hibridize edildiğinde herhangi bir sinyal oluşturmadığı, buna karşın *Babesia* sp. genotipine ait PZR ürünleri ile sinyal oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4, sıra

20, 27, 28, 32). Böylece yeni dizayn edilen bu probun, ilk defa bu çalışmada tespit edilen *Babesia* sp. izolatına spesifik olduğu anlaşılmış ve sahadan elde edilen bütün DNA örnekleri *Babesia* sp. yönünden de RLB ile incelenmiştir.

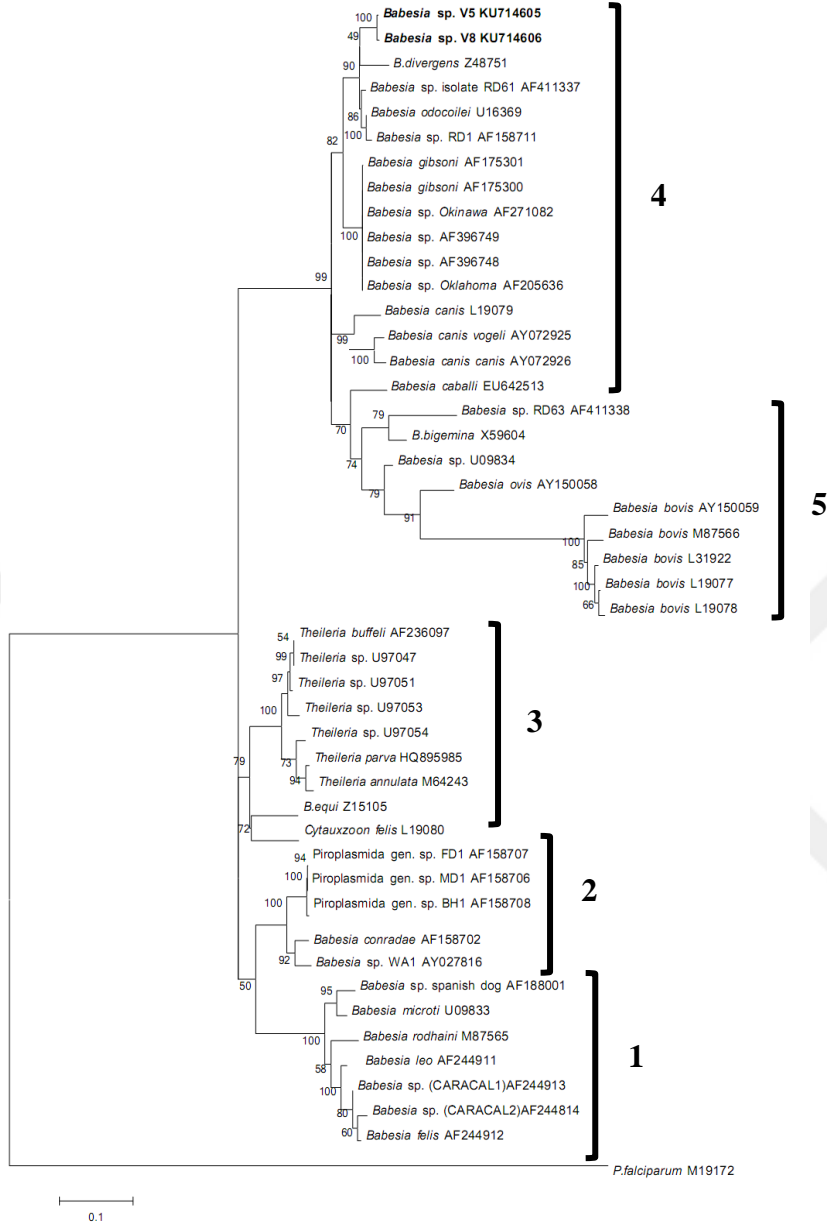
5.4 Filogenetik analiz

Bu çalışmada tanımlanan *Babesia* sp. genotipinin, gerek koyun ve keçiler için enfektif olan *Babesia* tür ve genotipleri ile BLAST analizinde yakın benzerlik veren *Babesia* türlerini (Şekil 6) ve gerekse diğer piroplasmidleri temsilen seçilen sekansları oluşturduğu filogenetik ağaç (Şekil 7) içerisindeki yeri belirlenmiştir. Şekil 6'dan anlaşılacağı gibi, bu çalışmada identifiye edilen *Babesia* sp. genotipinin bugüne kadar koyun ve keçilerde tanımlanan *Babesia* tür ve genotiplerinin oluşturduğu grupta yer almadığı, bunun yerine sığır ve insanlarda tanımlanan *B. divergens* ile geyiklerde tanımlanan *B. odocoilei* ve insan ve geyiklerde tanımlanan *Babesia* sp. EU1 (*Babesia venatorum*)'in oluşturduğu kümede yer aldığı görülmüştür.

Yine Şekil 7'den anlaşılacağı üzere, *Babesia* sp.'nin koyun ve keçileri enfekte eden *Babesia* türlerinin de içerisinde yer aldığı 5. grubu oluşturan Ungulibabesidler yerine, 4. grubu oluşturan Babesidler içerisinde yer aldığı görülmüştür.



Şekil 6: Bu çalışmada tanımlanan *Babesia* sp. izolatına ait 18S rRNA gen sekansları ile BLAST analizinde bunlara yakın benzerlik gösteren diğer *Babesia* tür ve genotiplerine ait sekansların oluşturduğu filogenetik ağaç (GTR+G modeli). Bu ağaç, MEGA 6 programı kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada tanımlanan *Babesia* sp. genotipine ait sekanslar bold olarak yazılmıştır.

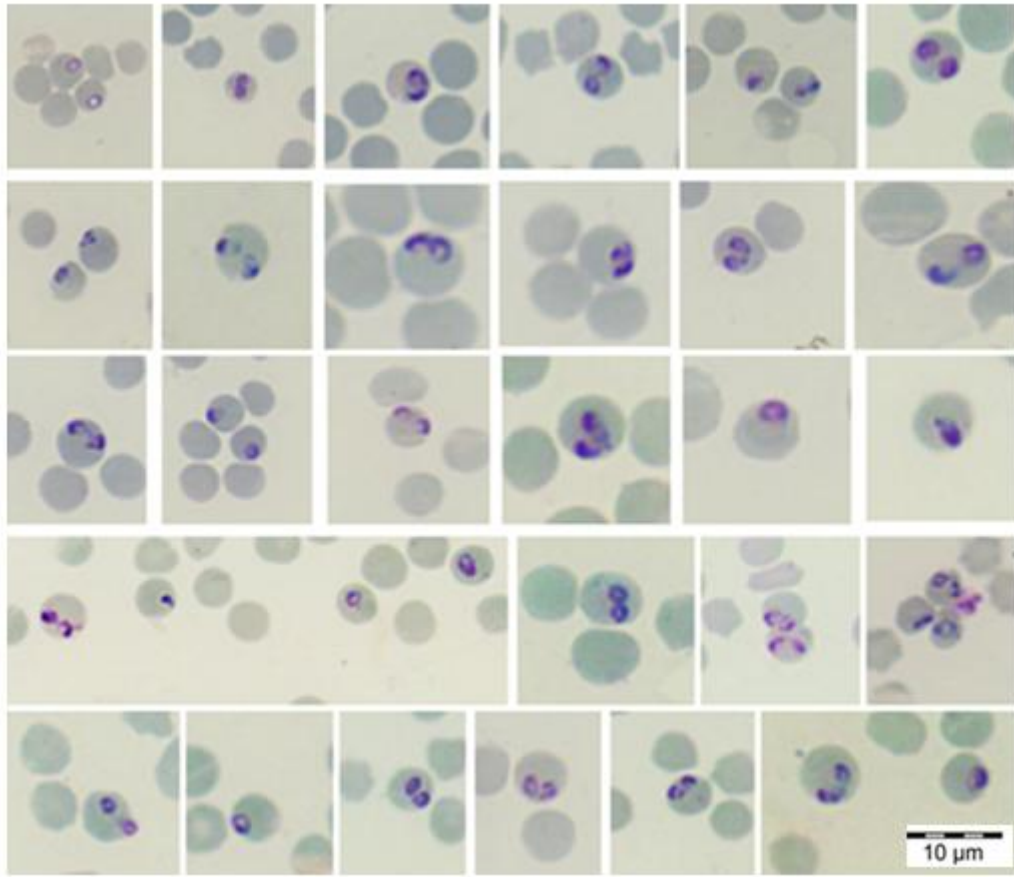


Şekil 7: Bu çalışmada tanımlanan *Babesia* sp. izolatına ait 18S rRNA gen sekansları ile GenBank'ta mevcut diğer piroplazmidlere ait sekansların oluşturduğu filogenetik ağaç (GTR+G modele dayalı Maximum Likelihood metodu). Archeopiroplazmidler (1. grup), Prototheileridler (2. grup), Theileridler (3. grup), Babesidler (4. grup) ve Ungulibabesidler (5. grup). Bu ağaç, MEGA 6 programı kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada tanımlanan *Babesia* sp. genotipine ait sekanslar bold olarak yazılmıştır.

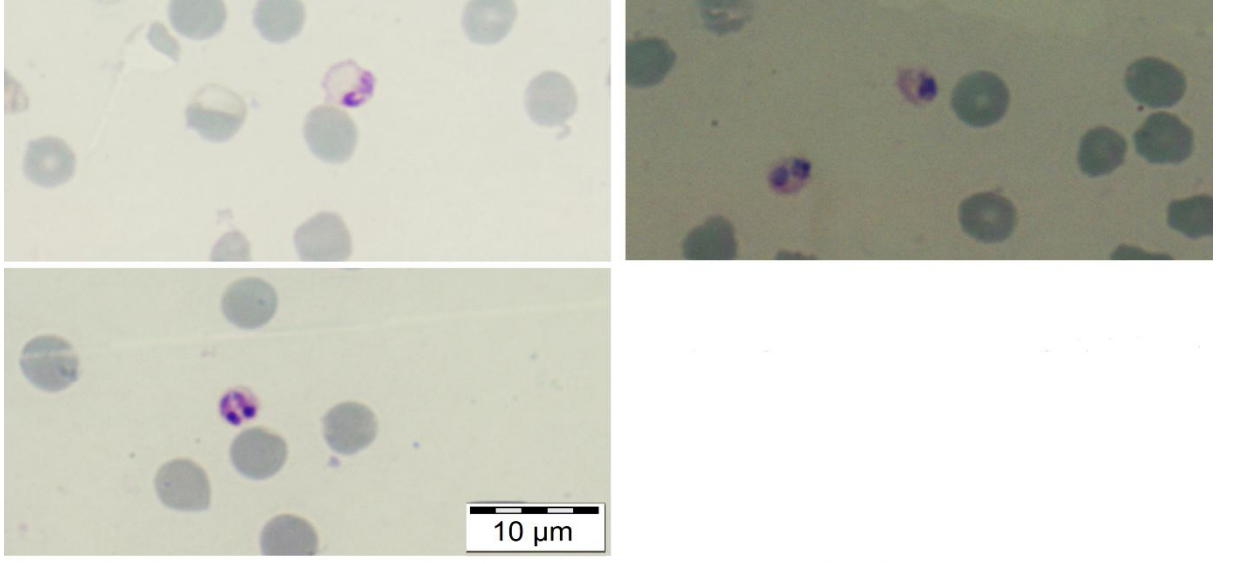
5.5 Mikroskopik muayene

Kan frotilerinin mikroskopik muayenesinde eritrositler içinde ve dışında tek ve çift armut şeklinde *Babesia* spp. (Şekil 8, 9), yuvarlak, oval ve yüzük şeklinde ise *Theileria* spp. (Şekil 10) piroplasm formlarına raslanmıştır.

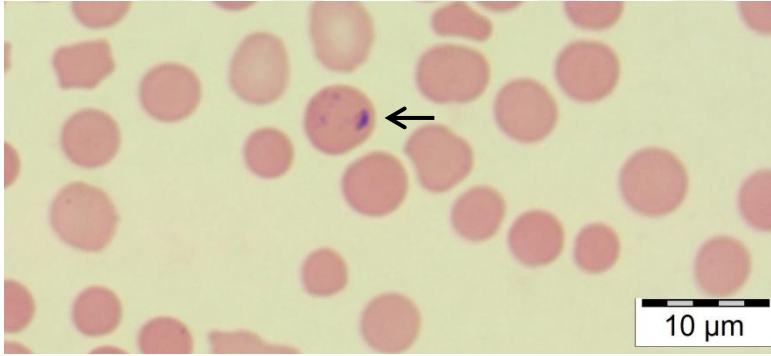
Bu araştırmanın saha çalışmaları esnasında Adana'da 2, Gaziantep'de 5 ve Adıyaman'da 3 olmak üzere toplam 10 koyunda klinik babesiosis (ateş, anemi, iştahsızlık, durgunluk) olgusu saptanmıştır.



Şekil 8: Doğal enfekte koyunlarda eritrosit içerisinde tek ve çift armut formunda *Babesia ovis* piroplazmalarının mikroskopik görüntüsü (orijinal).



Şekil 9: Doğal enfekte koyunlarda eritrosit dışında tek ve çift armut formunda *Babesia ovis* piroplazmalarının mikroskopik görüntüsü (orijinal).



Şekil 10. Doğal enfekte bir koyunda eritrosit içerisinde *Theileria ovis* piroplasm formu (orijinal).

5.6 Koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* enfeksiyonlarının prevalansı

Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illerinde 421'i koyun ve 379'u keçi olmak üzere toplam 800 hayvan *Theileria* ve *Babesia* türleri yönünden mikroskopik bakı, PZR ve RLB yöntemi ile incelenmiş ve sonuçların illere dağılımı Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10: Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illerinde mikroskopik bakı, PZR ve RLB sonuçlarının odaklara dağılımı

Odak	Teşhis metodu									
	Mikroskopik bakı						PZR		RLB	
	<i>Theileria</i> spp.			<i>Babesia</i> sp.						
	n	+	%	+	%	+	%	+	%	
Adana	200	2	1	6	3	40	20	58	29	
Mersin	200	7	3,5	4	2	31	15,5	43	21,5	
Gaziantep	200	9	4,5	11	5,5	96	48	117	58,5	
Adıyaman	200	6	3	11	5,5	57	28,5	74	37	
Toplam	800	24	3	32	4	224	28	292	36,5	

Buradan anlaşılacağı gibi, kan frotilerinin mikroskopik muayenesinde bölgedeki koyun ve keçilerin 24'ünde (%3) *Theileria* spp., 32'sinde (%4) ise *Babesia* spp. tespit edilmiştir. Mikroskopik bakıda *Theileria* spp. en yüksek %4,5 ile Gaziantep'te, en düşük %1 oranıyla Adana'da; *Babesia* spp. ise en yüksek %5,5 ile Gaziantep ve Adıyaman'da, en düşük ise %2 ile Mersin'de görülmüştür. *Theileria* ve *Babesia* spp. pozitif örneklerin illere göre dağılımı karşılaştırıldığında, ortaya çıkan farklılık istatistiksel olarak anlamlı

bulunmamıştır (*Theileria* spp., $P = 0,268$, $\chi^2 = 3,944$; *Babesia* spp., $P = 0,176$, $\chi^2 = 4,948$). *Theileria* ve *Babesia* enfeksiyonlarının dağılımı açısından ise anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($P = 0,276$, $\chi^2 = 1,184$).

Mikroskopik muayenede pozitif örnekler için DNA'lar kullanılarak yapılan PZR'de, parazit amplifikasyonu gerçekleşmiş ve RLB ile bu parazitlerin *T. ovis* ve *B. ovis* oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca mikroskobik ve RLB pozitif numuneler arasında rastgele seçilen 10 örneğin DNA dizi analizi yapılarak sonuçlar teyit edilmiştir.

Koyun ve keçilerden elde edilen DNA örnekleri RLB-F2/RLB-R2 primerleri ile PZR'a tabi tutulduğunda, 800 örneğin 224'ünde (%28) pozitiflik saptanmıştır. PZR pozitiflik oranı en yüksek Gaziantep (%48), en düşük Mersin'de (%15,5) tespit edilmiştir (Tablo 10). İllerde PZR ile elde edilen pozitiflik oranları arasındaki farklılık, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P = 0,0001$, $\chi^2 = 61,558$).

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünleri, *Theileria* ve *Babesia* tür ve genotiplerine özgü primerlerin bağlı olduğu membranda hibridizasyona tabi tutulduğunda, 292 örneğin (%36,5) *Theileria* veya *Babesia* tür ve genotipleri ile enfekte olduğu görülmüştür. RLB ile pozitiflik oranı en yüksek Gaziantep (%58,5), en düşük ise Mersin'de (%21,5) tespit edilmiştir (Tablo 10). İllere göre RLB pozitiflik oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P = 0,0001$, $\chi^2 = 66,055$).

Koyun ve keçilerde kan parazitlerini belirlemede mikroskopik bakı, PZR ve RLB'nin duyarlılığı karşılaştırılmış ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($P = 0,0001$, $\chi^2 = 203,235$). Mikroskopik bakıya göre

PZR ve RLB ($P = 0,0001$, $\chi^2 = 122,182$; $P = 0,0001$, $\chi^2 = 204,532$)'nin, PZR'ye göre ise RLB'nin daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir ($P = 0,0001$, $\chi^2 = 13,227$).

Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illerinde koyun ve keçilerden elde edilen 800 DNA örneği, RLB yöntemi ile *Theileria* ve *Babesia* enfeksiyonları yönünden incelenmiş ve sonuçların illere göre dağılımı Tablo 11'de verilmiştir.



Tablo 11: Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman’da koyun ve keçilerde RLB ile *Theileria* ve *Babesia* türlerinin dağılımı.

Odak	Konak	Örnek Sayısı	Toplam enfeksiyon (%)					Tek enfeksiyon (%)					Mix enfeksiyon (%)	
			<i>Theileria</i>					<i>Theileria</i>					<i>Theileria</i>	
			<i>T. ovis</i>	sp. MK.	<i>T. annulata/ T. lestoquardi</i>	<i>B. ovis</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>T. ovis</i>	sp. MK.	<i>T. annulata/ T. lestoquardi</i>	<i>B. ovis</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>T. ovis+B. ovis</i>	sp. MK+ <i>T. ovis</i>
Adana	Koyun	115	40 (%34,78)	1 (%0,87)	1 (%0,87)	9 (%7,83)	-	35 (%30,43)	-	1 (%0,87)	5 (%4,35)	-	4 (%3,48)	1 (%0,87)
	Keçi	85	5 (%5,88)	-	5 (%5,88)	2 (%2,35)	-	5 (%5,88)	-	5 (%5,88)	2 (%2,35)	-	-	-
	Σ	200	45 (%22,5)	1 (%0,5)	6 (%3)	11 (%5,5)	-	40 (%20)	-	6 (%3)	7 (%3,5)	-	4 (%2)	1 (%0,5)
Mersin	Koyun	78	19 (%24,36)	-	-	4 (%5,13)	-	17 (%21,79)	-	-	2 (%2,56)	-	2 (%2,56)	-
	Keçi	122	15 (%12,29)	-	-	-	7 (%5,74)	15 (%12,29)	-	-	-	7 (%5,74)	-	-
	Σ	200	34 (%17)	-	-	4 (%2)	7 (%3,5)	32 (%16)	-	-	2 (%1)	7 (%3,5)	2 (%1)	-
Gaziantep	Koyun	125	86 (%68,8)	-	9 (%7,2)	23 (%18,4)	-	64 (%51,2)	-	9 (%7,2)	1 (%0,8)	-	22 (%17,6)	-
	Keçi	75	21 (%28)	-	-	-	-	21 (%28)	-	-	-	-	-	-
	Σ	200	107 (%53,5)	-	9 (%4,5)	23 (%11,5)	-	85 (%42,5)	-	9 (%4,5)	1 (%0,5)	-	22 (%11)	-
Adıyaman	Koyun	103	45 (%43,69)	1 (%0,97)	5 (%4,85)	7 (%6,78)	-	39 (%37,86)	1 (%0,97)	5 (%4,85)	1 (%0,97)	-	6 (%5,82)	-
	Keçi	97	18 (%18,55)	-	3 (%3,09)	1 (%1,03)	-	18 (%18,55)	-	3 (%3,09)	1 (%1,03)	-	-	-
	Σ	200	63 (%31,5)	1 (%0,5)	8 (%4)	8 (%4)	-	57 (%28,5)	1 (%0,5)	8 (%4)	2 (%1)	-	6 (%3)	-
Toplam	Koyun	421	190 (%45,13)	2 (%0,47)	15 (%3,56)	43 (%10,21)	-	155 (%36,82)	1 (%0,24)	15 (%3,56)	9 (%2,14)	-	34 (%8,08)	1 (%0,24)
	Keçi	379	59 (%15,57)	-	8 (%2,11)	3 (%0,79)	7 (%1,84)	59 (%15,57)	-	8 (%2,11)	3 (0,79)	7 (%1,84)	-	-
	Σ	800	249 (%31,12)	2 (%0,25)	23 (%2,87)	46 (%5,75)	7 (%0,87)	214 (%26,75)	1 (%0,12)	23 (%2,87)	12 (%1,5)	7 (%0,87)	34 (%4,25)	1 (%0,12)

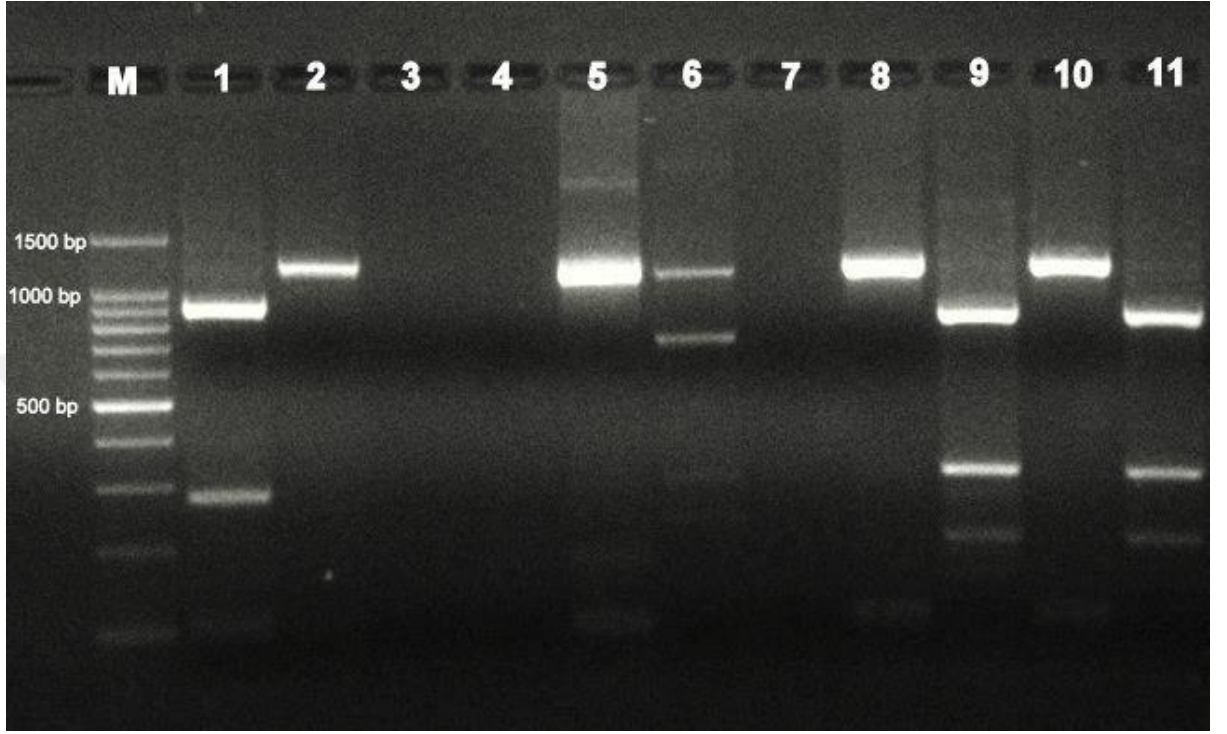
Tablo 11'den anlaşılacağı üzere, PZR ürünleri *Theileria* ve *Babesia* tür ve soy spesifik problemlerin bağlandığı membranda hibridizasyona tabi tutulduğunda, prob karşılıkları ile sinyal oluşturmuşlardır (Şekil 4). Buna göre bölgedeki koyun ve keçilerin tek ya da miks enfeksiyonlar şeklinde *T. ovis*, *Theileria* sp. MK, *T. annulata*/*T. lestoquardi*, *B. ovis* ve *Babesia* sp. ile enfekte oldukları belirlenmiştir. PZR ürünlerinin RLB hibridizasyonunda, 800 örneğin 249 (%31,12)'u *T. ovis*, 2 (%0,25)'si *Theileria* sp. MK, 23 (%2,87)'ü *T. annulata*/*T. lestoquardi*, 46 (%5,75)'sı *B. ovis* ve 7 (%0,87)'si *Babesia* sp. probuna sinyal vermiştir. Miks enfeksiyonlar *T. ovis* + *B. ovis* ve *T. ovis* + *Theileria* sp. MK şeklinde olmak üzere toplam 35 hayvanda belirlenmiştir.

İncelenen koyunlardan 190 (%45,13)'ü *T. ovis*, 2 (%0,47)'si *Theileria* sp. MK, 15 (%3,56)'sı *T. annulata*/*T. lestoquardi*, 43 (%10,21)'ü *B. ovis*, 34 (%8,08)'ü *T. ovis* + *B. ovis*, 1 (%0,24)'ü *T. ovis* + *Theileria* sp. MK ile enfekte bulunmuştur. Keçilerin ise 59 (%15,57)'unun *T. ovis*, 8 (%2,11)'inin *T. annulata*/*T. lestoquardi*, 3 (%0,79)'ünün *B. ovis* ve 7 (%1,84)'sinin *Babesia* sp. ile enfekte olduğu görülmüştür. Keçilerde miks enfeksiyona rastlanmamıştır. Koyun ve keçilerdeki RLB pozitiflik karşılaştırıldığında, gerek *Theileria* ve gerekse *Babesia* türlerinin görülme sıklığı keçilere göre koyunlarda daha yüksek bulunmuş ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($P = 0,0001$, $\chi^2 = 125,949$).

5.7 *Theileria annulata* ve *T. lestoquardi*'nin RFLP ile ayırımı

Theileria annulata ve *T. lestoquardi* 'nin RLB-F2 ve RLB-R2 primerleri ile çoğaltılan 18S rRNA geninin V4 değişken bölgesinde nükleotid dizilimleri aynı olduğundan, RLB'de her iki proba karşı sinyal veren örnekler *T. annulata*/*T.*

lestoquardi olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada 15 koyun ve 8 keçi olmak üzere toplam 23 örnek her iki proba sinyal vermiştir. RFLP analizi sonucunda bu örneklerin tamamının *T. annulata* olduğu görülmüştür (Şekil 10).



Şekil 11: RLB’de *T. lestoquardi* ve *T. annulata* probuna sinyal veren örneklerden amplifiye edilen (18S rRNA gen) PZR ürünlerinin Hpa II enzimi ile restriksiyonu sonucunda oluşan bant profillerinin agarose jel görüntüsü. M, 100 baz çiftlik marker; 1, *T. lestoquardi* (pozitif kontrol); 2, *T. annulata* (pozitif kontrol); 3, negatif kontrol; 4, *B. ovis* (saha örneği); 5, 8, 10, *T. annulata* (saha örneği); 6, *T. annulata-T. ovis* miks (laboratuvar miksi); 7, *Babesia* sp. (saha örneği); 9, 11, *T. ovis* (saha örneği).

5.8 Kene türleri

Çalışmanın yürütüldüğü illerde koyun ve keçilerden toplanan kenelerin ve kene türlerinin konak ve odaklara göre dağılımı Tablo 12 ve Tablo 13’de verilmiştir.

Buradan anlaşılacağı gibi, kan örneklerinin toplandığı esnada bölgedeki koyun ve keçilerin 5 farklı kene türü ile enfeste olduğu görülmüştür. Kene enfestasyonu tespit edilen hayvanlar üzerinden 546 adet kene toplanmış olup, bunlardan 301 (% 55,12)’i *R. bursa*, 178 (%32,60)’i *R. turanicus*, 55 (%10,07)’i *Hy. excavatum*, 8 (%1,46)’i *Haemaphysalis parva* (*Hae. parva*) ve 4 (%0,73)’ü *Hy. anatolicum* olarak identifiye edilmiştir.

Doymuş erişkin dişi keneler, yumurta elde etmek üzere etüve alınmış ve bunlardan toplam 72 adet yumurta kümesi elde edilmiştir. Yumurta kümelerinin 36’sının *R. bursa*, 30’unun *R. turanicus* ve 6’sının *Hae. parva*’ya ait olduğu saptanmıştır. Yumurta kümelerinden ekstrakte edilen DNA’lar, *Babesia* etkenleri yönünden incelenmiş ve *R. bursa*’ya ait iki örnekte *B. ovis* amplifikasyonu gerçekleşmiştir. Bu kenelerin kan emdiği koyunların da *B. ovis* ile enfekte oldukları görülmüştür.

Tablo 12: Koyun ve keçilerden toplanan kenelerin konak ve odaklara göre dağılımı.

Odak	Sürü sayısı	Enfeste sürü sayısı	Enfeste hayvan sayısı			Toplanan kene sayısı		
			Koyun	Keçi	Toplam	Koyun	Keçi	Toplam
Adana	11	5	38/115	23/85	61	98	34	132
Mersin	11	4	15/78	38/122	53	28	81	109
Gaziantep	11	6	33/125	18/75	51	120	41	161
Adıyaman	12	5	47/103	26/97	73	109	35	144
Toplam	45	20	133/421	105/379	238/800	355	191	546

Tablo 13: Koyun ve keçilerden toplanan ixodid kene türlerinin konak ve odaklara göre dağılımı.

Odak	<i>R. bursa</i>		<i>R. turanicus</i>		<i>Hae. parva</i>		<i>Hy. anatolicum</i>		<i>Hy. excavatum</i>	
	Koyun	Keçi	Koyun	Keçi	Koyun	Keçi	Koyun	Keçi	Koyun	Keçi
Adana	75	18	15	12	-	-	-	-	8	4
Mersin	20	62	8	19	-	-	-	-	-	-
Gaziantep	52	12	50	24	8	-	1	-	9	5
Adıyaman	45	17	40	10	-	-	2	1	22	7
Toplam	192	109	113	65	8	-	3	1	39	16
Σ ; %	301; 55,13		178; 32,60		8; 1,46		4; 0,73		55; 10,07	

6. TARTIŞMA

Türkiye'nin iklimi ve bitki örtüsü bakımından, ixodid kenelerin yerleşip biyolojik aktivitelerini devam ettirebileceği bir ülke olduğu yapılan çalışmalardan bilinmektedir. Buna bağlı olarak keneler tarafından nakledilen theileriosis ve babesiosis gibi hastalıklar bölgesel farklılıklar göstermekle birlikte yaygın olarak görülmektedir. Koyun ve keçilerde theileriosise neden olan 6 (*T. lestoquardi*, *T. uilenbergi*, *T. luwenshuni*, *T. separata*, *T. ovis* ve *T. recondita*), babesiosise neden olan 5 (*B. ovis*, *B. motasi*, *B. crassa*, *B. taylori* ve *B. foliata*) tür tanımlanmıştır (4, 14-18, 22, 48-53). *T. uilenbergi*, *T. luwenshuni* ve *T. lestoquardi*'nin yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden klinik, diğer *Theileria* türlerinin ise subklinik enfeksiyona neden olduğu belirtilmiştir (4, 15-20). *B. ovis*'in *B. motasi*'ye göre daha yüksek patojeniteye sahip olduğu (4), *B. crassa*'nın ise apatojen bir tür olduğu bildirilmiştir (50).

Son yıllarda koyun ve keçilerde *Theileria* soyuna bağlı *Theileria* sp. OT1, *Theileria* sp. OT3 ve *Theileria* sp. MK (63, 64), *Babesia* soyuna bağlı *Babesia* sp. BQ1 Lintan, *Babesia* sp. BQ1 Ningxian, *Babesia* sp. Tianzhu, *Babesia* sp. Madang, *Babesia* sp. Hebei, *Babesia* sp. Liaoning, *Babesia* sp. Xinjiang olarak adlandırılan farklı genotipler tanımlanmıştır. Ancak bunların patojeniteleri ve vektörleri ile ilgili detaylı bilgi bulunmamaktadır (65, 66). Son olarak Yunanistan'da koyunlarda hemolitik anemi seyirli hastalık tablosuna neden olan ve *B. lengau-like* olarak adlandırılan bir izolat rapor edilmiştir (71). Bu çalışmada farklı coğrafik karaktere sahip Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illerinde koyun ve keçilerde bulunan *Theileria* ve *Babesia* türlerinin varlığı ve yaygınlığı araştırılmış ve bölgedeki koyun ve keçilerin *T. ovis*, *T. annulata*, *Theileria* sp.

MK, *B. ovis* ve *Babesia* sp. ile enfekte oldukları belirlenmiştir. Türkiye’de koyun ve keçilerde *T. ovis*, *Theileria* sp. MK ve *B. ovis*’in varlığı bilinmektedir (64, 154, 155, 163-167). Ancak ilk defa bu çalışmada moleküler düzeyde keçilerde yeni bir *Babesia* türü ya da genotipi (*Babesia* sp.) tespit edilmiştir. Yine Türkiye’de ilk defa koyun ve keçilerde *T. annulata*’ya rastlanmıştır.

Theileria ve *Babesia* türlerinin teşhisi, eritrosit içindeki piroplasm formların morfolojik yapılarına bakılarak yapılabilmektedir. Ancak bu türlerin tanımlanmasında, parazitlerin yaşam çemberi, vektör kene ve coğrafik orijini gibi unsurların da göz önünde bulundurulması gerektiği belirtilmiştir (181). Düşük parazitemiden dolayı özellikle subklinik enfeksiyonlarda mikroskopik bakı ile tür düzeyinde parazitlerin identifikasyonu oldukça zordur. Birden fazla *Theileria* veya *Babesia* türünün iştirak ettiği miks enfeksiyonlarda bu durum daha da zorlaşmaktadır. Teşhis amacıyla, parazitlere karşı şekillenen antikorların belirlenmesi esasına dayanan serolojik yöntemler her iki hastalık ile ilgili epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmıştır (128-146). Serolojik testlerde, immun yanıtın zayıf olması, uzun süren portörlük durumunda antikorların her zaman belirlenememesi ve türler arasında çapraz reaksiyonların görülmesi gibi bazı olumsuzluklar ile karşılaşmıştır (78, 151). Bu olumsuzluklar, moleküler yöntemlerin parazitoloji alanında kullanılmaya başlamasıyla büyük ölçüde ortadan kalkmıştır. RLB, hem yüksek bir duyarlılığa sahip olması, hem de eş zamanlı olarak birden fazla türü tespit edebilmesi bakımından, *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* gibi keneler ile nakledilen patojenlerin belirlenmesinde son yıllarda tercih edilen bir yöntem olmuştur (16, 63, 64, 108, 113, 156, 160, 161, 163-167, 182). Bu çalışmada, hem konvensiyonel hem de moleküler yöntemler kullanılarak

koyun ve keçilerde *Babesia* ve *Theileria* türlerinin varlığı ve yayılışı araştırılmıştır. Bu amaçla Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illerinde muayene edilen toplam 800 koyun ve keçinin mikroskopik bakı ile 24 (%3)'ünün *Theileria*, 32 (%4)'sinin *Babesia* piroplazmaları taşıdığı tespit edilmiştir. Aynı hayvanların PZR ile 224 (%28), RLB ile 292 (%36,5)'sinin *Theileria* ve/veya *Babesia* enfeksiyonları yönünden pozitif olduğu görülmüştür (Tablo 10). Bu sonuçlar, daha önce yapılan çalışmalarda olduğu gibi (163-167), koyun ve keçilerde kan parazitlerini belirlemede mikroskopik bakıya göre PZR ve RLB ($P = 0,0001$, $\chi^2 = 122,182$; $P = 0,0001$, $\chi^2 = 204,532$), PZR'ye göre ise RLB'nin ($P = 0,0001$, $\chi^2 = 13,227$) daha duyarlı olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada, RLB membranına bağlanan problemlerin hemen hepsi spesifik karşılıkları olan *Theileria* ve *Babesia* türleri ile sinyal oluşturmuştur. Ancak beklenildiği gibi *T. lestoquardi* probu, *T. annulata* ile çapraz reaksiyon vermiştir (Şekil 4, sıra 1 ve 8). Daha önce yapılan çalışmalarda da benzer sonuç elde edilmiş ve bu durum, iki parazitin genetik yapısının birbirlerine çok benzer olması ile izah edilmiştir (16, 63, 162). Yine bu çalışmada, *T. luwenshuni* ile *Theileria* sp. OT1 arasında da çapraz reaksiyon gözlenmiştir (Şekil 4, sıra 3 ve 6). Bu durumun da, *T. lestoquardi* ile *T. annulata*'da da olduğu gibi parazitlerin genetik yapısındaki benzerlikten kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Zira *Theileria* sp. OT1 (AY533143) ve *T. luwenshuni* (JX469518)'nin 18S rRNA gen sekanslarına ait çoklu sıralama analizine bakıldığında, bu sekanslar arasında %99,89 oranında benzerlik olduğu görülecektir.

RLB yönteminde, Catchall ve soy spesifik proplar ile sinyal veren, ancak membrandaki tür ve genotiplere özgü proplar ile sinyal oluşturmayan amplikonların, yeni bir türün, alt türün yada farklı bir genotipin varlığını işaret edebileceği belirtilmiştir (16, 64, 160, 183). Bu çalışmada, 4 Catchall (*Theileria/Babesia*, *Theileria* spp., *Babesia* Catchall 1 ve Catchall 2) ve 11 tür spesifik prob kullanılmıştır (Tablo 5). *Theileria/Babesia* genel primerleri (RLB-F2/RLB-R2) ile koyun ve keçilere ait saha örneklerinden elde edilen PZR ürünlerinin büyük bir kısmı, *T. annulata*/*T. lestoquardi*, *T. ovis*, *Theileria* sp. MK ve *B. ovis* spesifik prob karşılıkları ile sinyal verirken, bazı amplikonlar sadece Catchall ve *Babesia* soy spesifik proplar ile sinyal oluşturmuştur (Şekil 4, sıra 20, 27, 28, 32). Bunlardan iki örneğin 18S rRNA sekans analizleri, koyun ve keçilerde bugüne kadar bilinen *Babesia* tür (*B. ovis*, *B. motasi* ve *B. crassa*) ve genotiplerinden (*Babesia* sp. Lintan, *Babesia* sp. Madang, *Babesia* sp. Tianzhu, *Babesia* sp. Ningxian, *Babesia* sp. Hebei, *Babesia* sp. Liaoning, *Babesia* sp. Xinjiang) genetik olarak farklı yeni bir *Babesia* tür ya da genotipin varlığını göstermiştir (Tablo 9). Bu sekansların, filogenetik ağaçta koyun ve keçilerdeki *Babesia* tür ve genotiplerine ait küme yerine farklı bir kümede yer aldığı görülmüştür (Şekil 6). Yine bu sekansların, piroplasmidlerin filogenetik olarak yapıldığı 5'li gruplandırılmada (184), koyun ve keçilerde bulunan *Babesia* türlerinin de içinde yer aldığı 5. grup olan Ungulibabesidler yerine, karnivorlardaki *Babesia* türleri ile *B. divergens* ve *B. odocoilei* türlerini içeren ve 4. grubu oluşturan Babesidler içerisinde yer almıştır.

Ayrıca 2010 yılında ilk defa Güney Afrika'da yabani kedilerde *B. lengau* sp. olarak adlandırılan yeni bir *Babesia* türü identifiye edilmiş (69) ve bunun evcil kedilerde hemolitik anemi seyirli klinik enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir (70). Daha sonra genetik olarak *B. lengau*'ye yakın benzerlik gösteren ve *B. lengau*-like olarak adlandırılan bir izolatın, Yunanistan'da koyunlarda hemolitik anemi seyirli hastalık tablosuna neden olduğu rapor edilmiştir (71). Bu çalışmada tespit edilen *Babesia* sp. izolatına ait sekansların, koyun ve keçilerdeki *Babesia* tür ve genotiplerinde olduğu gibi, *B. lengau*-like izolatından da gerek genetik ve gerekse filogenetik olarak farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 9, Şekil 6).

Babesia sp. izolatına ait sekanslar ile *B. crassa*, *B. motasi* ve *B. ovis* sekansları arasında Multiple Alignment yapılarak yeni bir prob dizayn edilmiştir (Şekil 5). Bu probun RLB'de sadece söz konusu *Babesia* izolatına ait PZR ürünlerine karşı sinyal oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4, sıra 20, 27, 28, 32).

Bu çalışmada elde edilen gerek RLB ve gerekse genetik, filogenetik ve Multiple Alignment sonuçları, yeni bir *Babesia* türü, alt türü ya da genotipinin varlığını göstermiştir (Tablo 9, Şekil 5, 6 ve 7). Ancak tür tanımlaması için vektör kene, detaylı morfolojik yapı, patojenite, biyolojik siklus gibi genetik olmayan ilave verilerin de bulunmasının gerekli olduğu ifade edilmiştir (185). Bu sebeple bölgede keçilerde saptanan bu izolat, şimdilik *Babesia* sp. olarak adlandırılmıştır.

Mersin'de keçilerde tespit edilen *Babesia* sp.'nin, koyun ve keçilerdeki *Babesia* tür ve genotiplerinden ziyade *B. divergens*, *Babesia* sp. EU1 (*B. venatorum*) ve *B. odocoilei*'ye benzer olduğu tespit edilmiştir (Tablo 9, Şekil 6). *B. divergens*'in sığırlarda klinik enfeksiyona neden olduğu bilinmektedir (186). *B. venatorum* (*Babesia* sp. EU1) karaca, dağ keçisi ve geyiklerde bulunan bir tür

olup (90; 187-190), bunun İsviçre ve Hollanda'da geyiklerde klinik babesiosise yol açtığı bildirilmiştir (191). İlk defa 1970 yılında Amerika'nın Texas eyaletinde beyaz kuyruklu geyiklerde tanımlanan *B. odocoilei*'nin, Kanada ve ren geyiği ile karibularda zaman zaman öldürücü olabilen klinik babesiosise neden olduğu bildirilmiş (192, 193), bu türün koyun, keçi ve splenektomili buzağılardaki nakil çalışmalarında başarı sağlanamamıştır (194). *B. divergens* ve *B. venatorum* aynı zamanda zoonotik karektere de sahip olup, özellikle dalağı alınmış insanlarda bu türlerden kaynaklanan klinik enfeksiyonlar rapor edilmiştir (195, 196). Bu çalışmada *Babesia* sp. pozitif 7 keçinin hiç birinde, kan örneği alındığı sırada babesiosisi işaret edecek herhangi bir klinik bulgu (ateş, anemi, iştahsızlık, durgunluk) gözlenmemiştir. Ayrıca bu hayvanlara ait kan frotilerinin mikroskopik muayenesinde, eritrositler içerisinde piroplasm formlara da rastlanmamıştır. Bu veriler, keçilerde ilk defa tespit edilen *Babesia* sp.'nin patojenitesi ile ilgili yorum yapmak için yeterli görülmemiştir. Bu izolat ile ilgili olarak, keçilerin esas veya rezervuar konak olup olmadığı, vektör kene, detaylı morfolojik yapı, patojenite, biyolojik siklus gibi verilerin ortaya konması için bölgede detaylı ilave çalışmaların yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

RLB yöntemi başta olmak üzere moleküler tekniklerin parazitoloji alanında kullanımı, bir taraftan parazitlerin doğru adlandırılmasını, ya da tek parazit türü yerine birden çok genotipi içeren grup olduğunun anlaşılmasını, diğer taraftan birçok yeni tür, alt tür ve genotipin ortaya çıkarılmasını sağlamıştır. Zira son yıllara kadar Çin'de koyun ve keçilerde klinik theileriosise neden olan türün *T. lestoquardi* olduğu ileri sürülmüştür (197). Ancak elde edilen bir takım genetik veriler sonucunda, bu parazitin *T. lestoquardi*'den farklı olduğu anlaşılmış ve

önce *Theileria* sp. China olarak tanımlanmıştır (162). Daha sonra bunun, *Theileria* sp. China 1 ve *Theileria* sp. China 2 olmak üzere farklı iki genotipinin bulunduğu belirlenmiş (16) ve en sonunda bunların yeni türler olduğu anlaşılmış ve *T. luwenshuni* ve *T. uilenbergi* olarak adlandırılmıştır (17, 198). Aynı şekilde İspanya’da koyunlarda sadece *T. ovis* enfeksiyonlarının varlığı bilinirken, yapılan genetik çalışmalar sonucunda, *Theileria* sp. OT1 ve *Theileria* sp. OT3 olarak isimlendirilen farklı iki genotipin de bulunduğu ortaya konmuştur (63). Bu bağlamda Türkiye’de koyun ve keçilerde genetik olarak farklı en az üç *Theileria* türü ya da genotipinin (*T. ovis*, *Theileria* sp. OT3 ve *Theileria* sp. MK) varlığı rapor edilmiştir (64, 153, 155, 164, 166, 167).

Moleküler tekniklerin parazitoloji alanında kullanımı, birçok kan parazitinin normal konağı dışında beklenmedik konaklarda bulunabileceğini de göstermiştir. Yapılan moleküler çalışmalarda, köpeklerin *T. annulata* (80, 81), *B. caballi* (82), *B. felis* (83), *B. microti* (84); kedilerin *B. canis* (85), *B. vogeli*, *T. ovis*, *B. bigemina* (86); atların *B. microti* (87); keçilerin *B. bigemina* (88); koyunların *B. bigemina* ve *B. bovis* (89); geyiklerin ise *B. divergens* (90) ile enfekte olabildikleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada, bölgedeki koyun ve keçilerin *T. annulata* ile enfekte oldukları görülmüştür. Konak değişimi (parazitin normalde bulunması gereken konak yerine başka bir konakta bulunması) olarak ifade edilen bu durumun, biyolojik ve patolojik önemi tam anlamıyla bilinmemektedir. Ancak bu durum, kan parazitlerinin hayatta kalma stratejileri olarak yorumlanmıştır (89).

Sığırlar için enfektif olan *T. annulata* ile koyun ve keçiler için enfektif olan *T. lestoquardi* arasında genetik, antijenik, biyolojik, morfolojik, vektör kene ve patojenite bakımından yakın bir ilişki olduğu bildirilmiştir (162). Yapılan

çalışmalarda *T. annulata* sporozoitlerinin koyun ve keçi mononükleer hücrelerini *in-vitro* (77, 199) ve *in-vivo* (78) yöntemlerle enfekte ettiği gösterilmiştir. Deneysel olarak *T. annulata* sporozoitlerinin koyunları enfekte edebildiği, şizontların geliştiği fakat piroplasm formlarının gelişmediği ve orta dereceli bir enfeksiyon şekillendiği rapor edilmiştir (78). *T. annulata* şizontları kullanılarak yapılan başka bir deneysel çalışmada, şizontların *in-vitro* olarak koyun, keçi ve sığır eritrositlerini enfekte edebildiği ve piroplasm formlarının geliştiği belirtilmiştir (200). Aynı çalışmada *in-vivo* olarak koyun ve keçilerin şizontlarla enfekte olmadığı, piroplasm formlarının oluşmadığı ve sadece orta dereceli bir ateşin meydana geldiği rapor edilmiştir. Enfekte keneler kullanılarak yapılan başka bir deneysel çalışmada, *T. annulata*'nın koyunlara nakli başarılı olmuştur (76). Ayrıca saha koşullarında yapılan birçok çalışmada (79, 95, 98, 104), koyunların *T. annulata* ile enfekte olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, 15'i koyun ve 8'i keçi olmak üzere toplam 23 (%2,87) hayvanda *T. annulata* tespit edilmiştir. Ancak bu hayvanların hiç birinde theileriosise ait klinik bulgu gözlenmemiştir. Yine bu hayvanların kan frotilerinde etken tespit edilememiştir.

Bu çalışmanın yürütüldüğü illerde koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin varlığı, yayılışı ve moleküler karakterizasyonları ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Adana'nın bazı bölgelerinde koyunlarda mikroskopik yöntemle *B. ovis*'in bulunduğu bildirilmiştir (201). Adıyaman'da ise koyun ve keçilerden temin edilen 88 kan örneği piroplasm etkenleri yönünden incelenmiş ve 7 örnekte pozitiflik saptanmıştır (64). Bu çalışmada, her iki ilde de gerek mikroskopik bakı ve gerekse PZR ve RLB ile *T. ovis* ve *B. ovis*'in varlığı

ortaya konmuş, ayrıca bu iki ilde, koyunlarda *B. ovis*'ten kaynaklanan klinik enfeksiyonlar tespit edilmiştir.

Türkiye'de koyun ve keçilerde theileriosis ve babesiosis ile ilgili başlangıçta mikroskopik bakı, daha sonra serolojik ve son olarak moleküler yöntemlerin kullanıldığı çok sayıda araştırma yapılmış ve *T. lestoquardi* (202, 203), *T. ovis* (64, 126, 164-167), *Theileria* sp. OT3 (64, 166), *Theileria* sp. MK (64, 166, 167), *B. ovis* (64, 128-146, 163-166), *B. motasi* (168, 169) ve *B. crassa* (170, 171)'nin varlığı bildirilmiştir. Ancak, bu türlerden *T. lestoquardi* (İç, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi) ve *B. motasi* (Karadeniz bölgesi ve Van)'nin varlığı sadece mikroskopik bakı sonuçlarına dayandırılmış olup (168, 169, 202, 203), son yapılan moleküler ve serolojik çalışmalarda bu iki türün varlığına ilişkin bir kayda rastlanmamıştır (64, 126, 153, 164-166). *B. crassa* ise moleküler olarak *Haemaphysalis* türü kenelerde bildirilmiştir (170, 171). Bu çalışmada koyun ve keçilerde *T. ovis*, *Theileria* sp. MK ve *B. ovis* tespit edilmiş olup, bu sonuçlar daha önce yapılan moleküler çalışmaları destekler niteliktedir.

Türkiye'de yapılan çalışmalarda, mikroskopik bakı ile koyun ve keçilerde theileriosis prevalansının %1,54-59 (64, 123, 125, 126, 127, 153, 164, 166, 167), babesiosis prevalansının ise %0,49-67,4 (123, 124, 127, 129-133, 138, 141, 153, 154, 164) arasında değiştiği bildirilmiştir. Karadeniz bölgesinde yapılan bir çalışmada, toplam 1128 koyun ve keçide *Babesia* piroplasm formlarına rastlanmamıştır (166). Serolojik çalışmalarda her iki hastalığın prevalansının çok yüksek olduğu (theileriosis %8,99-60,26, babesiosis %8,92-91,02) rapor edilmiştir (128-146). Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illerinde toplam 800 koyun ve keçi üzerinde yürütülen bu çalışmada, mikroskopik prevalans

theileriosis için %3, babesiosis için %4 olarak tespit edilmiş, bu prevalans değerlerinin düşük düzeyde de olsa Türkiye'nin diğer yörelerinde yapılan çalışmalarda saptanan mikroskobik prevalans değerleri içerisinde yer aldığı görülmüştür. Gerek theileriosis ve gerekse babesiosisin mikroskobik prevalans marjının çok geniş olması (theileriosis %1,54-59, babesiosis %0,49-67,4), araştırmaların yürütüldüğü bölgelerdeki coğrafik farklılık, örnek toplama mevsimi, froinin perifer veya sistemik kandan hazırlanması, vektör kene dağılımı gibi birçok faktöre bağlı olarak değişebileceği şeklinde yorumlanmıştır. Seroprevalansın yüksek olması ise, serolojik testlerde çapraz reaksiyonlar ile yanlış pozitifliklerin olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

Türkiye'de koyun theileriosisinin moleküler yöntemlerle belirlenmesine yönelik ilk çalışma Doğu Anadolu Bölgesinde yürütülmüş, bu çalışmada 218 koyunun 90 (%41,2)'ninde *Theileria* spp. pozitif bulunmuştur (153). Doğu Anadolu Bölgesinden 300 koyun ve 100 keçide *Babesia* enfeksiyonlarını belirlemeye yönelik bir çalışmada *B. ovis* spesifik PZR ile 32 koyun ve 1 keçide (%8,25) *B. ovis* tespit edilmiştir (154). RLB yöntemi Türkiye'de ilk defa Kayseri yöresinde koyunlarda kullanılmış, incelenen 111 örneğin %2,7'sinde *B. ovis*, %34,2'sinde *T. ovis*'in varlığı ortaya konmuştur (163). Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinden 705 koyun ve 215 keçide *Babesia* ve *Theileria* türleri ve yayılışları RLB ile araştırılmış, en yaygın türün %34,56 ile *T. ovis* olduğu, bunu *B. ovis* (%5,43) ve *Theileria* sp. MK (%1.30)'nın izlediği ve *Theileria* sp. OT3'ü en düşük yayılışa (%0.43) sahip olduğu tespit edilmiştir (64). Kayseri ili Yeşilhisar yöresinde 200 koyun ve 100 keçi RLB yöntemi ile *T. ovis* ve *B. ovis* yönünden incelenmiş, *B. ovis*'e %3,7, *T. ovis*'e ise %37,6 oranda rastlanmıştır

(164). Orta Anadolu bölgesindeki Kayseri, Sivas ve Yozgat illerinden 421 koyun ve 152 keçinin kullanıldığı bir çalışmada RLB ile *B. ovis* %2,6, *T. ovis* ise %33,9 oranında tespit edilmiştir (165). RLB ile Karadeniz bölgesinde 1128 koyun ve keçide yürütülen bir çalışmada, *T. ovis*'in %28,99, *B. ovis*'in %0,44, *Theileria* sp. OT3'ün %2,04 ve *Theileria* sp. MK'nın %0,62 oranında yayılış gösterdiği rapor edilmiştir (166). Doğu Karadeniz bölgesinde ise *T. ovis* %18,9, *Theileria* sp. MK %0,99, *Theileria* sp. OT3 %0,43 oranında bulunmuştur (167).

Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illerini kapsayan bu çalışmada, RLB ile toplam 800 koyun ve keçinin 292 (%36,5)'sinin *Theileria* ve/veya *Babesia* enfeksiyonları yönünden pozitif olduğu görülmüştür. İllere göre RLB pozitifliğinin %21,5 ile %58,5 arasında değiştiği (Tablo 10), bölgedeki koyun ve keçilerin %31,12'sinin *T. ovis*, %5,75'inin *B. ovis*, %2,87'sinin *T. annulata*, %0,87'sinin *Babesia* sp. ve %0,25'inin ise *Theileria* sp. MK ile enfekte oldukları belirlenmiştir. Gerek bu çalışmada ve gerekse daha önce yapılan yukarıdaki çalışmalarda elde edilen sonuçlar, farklı coğrafik yapı ve iklime sahip bölgeler hatta illerde koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin prevalansında değişkenlik olmakla beraber, Türkiye'nin hemen her bölgesinde bulunduğu ve *Theileria* türlerinin daha yaygın olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada, gerek *Theileria* ve gerekse *Babesia* türlerinin görülme sıklığı keçilere göre koyunlarda daha yüksek bulunmuş ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($P = 0,0001$, $\chi^2 = 125,949$). Daha önce yapılan araştırmalarda da benzer sonuç elde edilmiştir (4, 63, 204). Bu durum, babesiosisden iyileşen hayvanlarda parazitemi oranının hızla düşerek belirlenemeyecek düzeye inmesiyle izah edilmiştir (205). Yine bu çalışmada, daha

önceki çalışmalarda (64, 166) olduğu gibi koyun ve keçilerde kan parazitlerini belirlemede mikroskopik bakıya göre PZR ve RLB ($P = 0,0001$, $\chi^2 = 122,182$; $P = 0,0001$, $\chi^2 = 204,532$), PZR'ye göre ise RLB'nin daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir ($P = 0,0001$, $\chi^2 = 13,227$). Buna göre RLB'nin, gerek yüksek duyarlılığa sahip olması dolayısı ile taşıyıcı (portör) hayvanların populasyon içindeki oranının belirlenmesi ve gerekse miks enfeksiyonlar ile yeni tür ya da genotiplerin ortaya konmasında iyi bir teşhis metodu olarak kullanılabilceği kanaatine varılmıştır.

Bu çalışmada, Doğu Anadolu Bölgesi (64) ile Karadeniz Bölgesinde (166) RLB yöntemi ile yapılan çalışmalara benzer olarak %0,25 oranında *Theileria* sp. MK genotipi tespit edilmiş, her iki bölgede de yüksek oranda yayılış gösteren *T. ovis*'in (%28,99- 34,56), bu bölgede de en yaygın tür (%31,12) olduğu görülmüştür. Doğu Anadolu ve Karadeniz bölgelerinde %0,4-5,4 arasında yayılış gösteren *B. ovis*'e bu çalışmada %5,75 oranında rastlanmıştır. İlk defa İspanyada koyunlarda tespit edilen (63), daha sonra RLB ile yapılan çalışmalarda Türkiye'de de varlığı ortaya konan (64, 166) *Theileria* sp. OT3' e bu çalışmada rastlanmamıştır.

Türkiye'de koyun ve keçilerde bu güne kadar Ixodidae ailesine bağlı çok sayıda kene türü belirlenmiştir. Elazığ yöresinde yapılan bir çalışmada, koyunların, *Hy. excavatum*, *Hyalomma detritum* (*Hy. detritum*), *Hyalomma marginatum* (*Hy. marginatum*), *R. sanguineus*, *R. bursa*, *Hae. parva*, *Hae. sulcata*, *Hae. punctata*, *Dermacentor marginatus* (*D. marginatus*), *Boophilus annulatus* (*B. annulatus*), *O. lahorensis* türleri ile enfeste olduğu, bunlardan *Hae. punctata*, *D. marginatus* ve *O. lahorensis* hariç diğer türlerin keçilerde de

bulunduğu, koyun ve keçilerde en fazla *R. bursa*'ya rastlandığı bildirilmiştir (206). Güney Marmara bölgesinde yapılan çalışmada, koyunların en fazla *R. bursa*, keçilerin ise *I. ricinus* ve *R. bursa* ile enfeste olduğu kaydedilmiştir (207). Burdur yöresinde yapılan çalışmada, koyunlarda, *R. turanicus*, *R. bursa*, *Hae. parva*, *D. marginatus*, *Dermacentor niveus* (*D. niveus*)'un erişkinleri ile *I. ricinus*, *Hy. excavatum* ve *Ornithodoros* sp. nimflerine; keçilerde, *R. turanicus*, *D. niveus*, *D. marginatus*, *Hae. parva*'nın erişkinleri ve *Rhipicephalus* spp. nimflerine rastlanmıştır. Aynı alışmada *R. bursa*'nın koyunlar üzerinden toplanan kenelerin %10,9'unu oluşturduğu, ancak bu kene türüne keçilerde rastlanmadığı bildirilmiştir (208). Kayseri yöresinde, koyun ve keçilerde, *R. bursa*, *R. turanicus*, *R. sanguineus*, *D. niveus*, *Hy. marginatum*, *Hae. parva*, ve *Hae. sulcata* türlerine rastlandığı bildirilmiştir (209). Muş ve Malatya illerinde koyunlar üzerinde *R. bursa* ve *R. sanguineus* türleri tespit edilmiştir (64). Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illerinde koyun ve keçilerde ixodid kene türleri ile ilgili bir kayıda rastlanmamıştır. Bu alışma ile bölgedeki koyun ve keçilerde *R. bursa*, *R. turanicus* ve *Hy. excavatum*, *Hae. parva* ve *Hy. anatolicum* olmak üzere 5 farklı kene türü tespit edilmiş olup, kene enfestasyonlarının %55,12'sinin *R. bursa*'dan kaynaklandığı görülmüştür.

Yukarıdaki çalışmalardan koyun ve keçilerde yaygın olarak görülen kene türlerinden birinin *R. bursa* olduğu anlaşılmaktadır. Koyun ve keçi piroplasmosisinin epidemiyolojisinde vektör kenenin biyo-ekolojisinin önemli olduğu ve *R. bursa* ile enfeste alanlarda babesiosisin her yıl görüldüğü bildirilmiştir (210). Bu kenenin tükürük bezlerinde elektron mikroskopuyla *B. ovis* tespit edilmiştir (211). Yine son yapılan moleküler çalışmalarda, *R.*

bursa'nın yumurta ve tükürük bezlerinde *B. ovis*'e rastlanmıştır (97, 212, 213). Bu kenenin, *T. ovis* ile de enfekte olduğu sahada koyunlar üzerinden toplanan örneklerde gösterilmiştir (42). Bu çalışmada, doymuş erişkin kenelerden elde edilen yumurta kümeleri *Babesia* türleri yönünden incelenmiş ve *R. bursa*'ya ait iki örnekte *B. ovis* saptanmıştır. Bu sonuçlar, *R. bursa*'nın hem *T. ovis* hem de *B. ovis*'in epidemiyolojisinde önemli rol oynayabileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak;

- Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illerinde koyun ve keçilerde 3 *Theileria* (*T. ovis*, *T. annulata*, *Theileria* sp. MK) ve 2 *Babesia* (*B. ovis*, *Babesia* sp.) türü ya da genotipi (*Babesia* sp.) tespit edilmiş ve bunların moleküler prevalansı ortaya konmuştur.

- Bölgedeki koyun ve keçilerde özellikle *B. ovis* ve *T. ovis*'in yaygın olarak bulunduğu ve *B. ovis*'ten kaynaklanan klinik enfeksiyonların görüldüğü saptanmıştır.

- Moleküler düzeyde keçilerde ilk defa bu çalışmada yeni bir *Babesia* türü ya da genotipi (*Babesia* sp.) tespit edilmiş, ancak bu yeni genotipin daha iyi tanımlanabilmesi için patojenite, vektör kene ve moleküler epidemiyoloji ile ilgili daha kapsamlı araştırmaların yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

- Bu tür çalışmalarda RLB yönteminin kullanılmasının, yeni genotiplerin ortaya çıkarılması açısından önemli olduğu anlaşılmıştır.

- Türkiye'de ilk defa koyun ve keçilerde *T. annulata* pozitifliği tespit edilmiştir.

- RLB'nin mikroskopik bakı ve PZR'ye göre çok daha duyarlı olduğu, *Theileria* ve *Babesia* türleri ile enfekte portör hayvanların belirlenmesinde bu

metodun kullanılması ile daha sağlıklı ve doğru sonuçların elde edilebileceği görülmüştür.

- Bölgede koyun ve keçilerde klinik enfeksiyona neden olan türün *B. ovis* olduğu, *B. motasi* ve *B. crassa*'nın bu bölgede koyun ve keçilerde bulunmadığı görülmüştür.

- Bölgedeki koyun ve keçilerde *Theileria* türlerinin, *Babesia* türlerine göre daha yaygın olduğu, çeşitli ülkelerde koyun ve keçilerde tespit edilen *T. lestoquardi*'nin bu bölgede bulunmadığı ve bölgede en yaygın türün *T. ovis* olduğu, ortaya konmuştur.

- Türkiye'de *R. bursa*'nın hem *T. ovis* ve hem de *B. ovis*'in epidemiyolojisinde önemli rol oynayabileceği ortaya çıkmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QA/E/05.05.2015>.
2. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18851/05.11.2014>.
3. Sonenshine DE. Biology of ticks. New York: Oxford University Press, 1993.
4. Friedhoff KT. Tick-borne disease of sheep and goats caused by *Babesia*, *Theileria* or *Anaplasma* spp. *Parassitologia* 1997; 39: 99-109.
5. Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology* 2004; 129: 3-14.
6. Yin H, Luo J. Ticks of small ruminants in China. *Parasitol Res* 2007; 2: 187-9.
7. Vollmer D. Enhancing the effectiveness of sustainability partnerships summary of a workshop, The National Academies Press, 2009
8. İnci A, Çakmak A, Çam Y ve ark. Kayseri yöresinde tropikal theileriosis'e bağlı ekonomik kayıplar. *Türkiye Parasitol Derg*, 2002; 26: 156-160.
9. de Castro JJ. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet Parasitol* 1997; 71(2-3): 77-97.
10. Adl SM, Simpson AG, Lane CE, et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 2012; 59: 429–493.
11. Mans BJ, Pienaar R, Latif AA. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *Int J Parasitol Parasites Wild* 2015; 4(1): 104-18
12. Anonymous. "Systema Naturae 2000" <http://sn2000.taxonomy.nl/> 19.11.2011.
13. Neitz WO. Theileriosis, gonderiosis and cytauxzoonoses: a review. *Onderstepoort J Vet Res* 1957; 27: 275–430.
14. Hoosmand- Rad P, Hawa NY. Malignant theileriosis of sheep and goats. *Trop Anim Health Pro* 1973; 5: 97-102.
15. Luo J, Yin H. Theileriosis of sheep and goats in China. *Trop Anim Health Prod* 1997; 29(4): 8-10.
16. 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.

17. Yin H, Schnittger L, Luo J, Seitzer U, Ahmed JS. Ovine theileriosis in China: a new look at an old story. *Parasitol Res* 2007; 101(2): 191-195.
18. Yin H, Liu Z, Guan G, et al. Detection and differentiation of *Theileria luwenshuni* and *T. uilenbergi* infection in small ruminants by PCR. *Transbound Emerg Dis* 2008; 55(5-6): 233-237.
19. Alani AJ, Herbert IV. Pathogenesis of infection with *Theileria recondita* (Wales) isolated from *Haemaphysalis punctata* from north Wales. *Vet Parasitol* 1988; 28(4): 293-301.
20. Uilenberg G. *Theileria* species of domestic livestock. In: Irvin, A. D., Cunningham, M. P. and Young, A. S. (Editors). *Advances in the control of theileriosis*. Martinus Nijhoff, The Hague 1981: pp 4-37.
21. Mehlhorn H, Schein E. The piroplasms: life cycle and sexual stages, *Adv Parasitol* 1984; 23: 37-103.
22. Levine ND. *Veterinary Protozoology*. Ames, Iowa: Iowa State Uni, 1985.
23. Levine ND. *Protozoon Parasites of Domestic Animals and of Man*. 2th Ed. Minneapolis: Burgers Publish, 1973.
24. Liu Z. Identification of novel genes for the development of a rapid diagnostic test for *Theileria uilenbergi* infection by screening of a merozoite cDNA library. Phd thesis, München: Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2010.
25. Li Y, Luo J, Guan G, et al. Experimental transmission of *Theileria uilenbergi* infective for small ruminants by *Haemaphysalis longicornis* and *Haemaphysalis qinghaiensis*. *Parasitol Res* 2009; 104: 1227-1231.
26. Guo S, Yuan Z, Wu G, et al. Epidemiology of ovine theileriosis in Ganan region, Gansu Province, China. *Parasitol Res* 2002; 88: 36-37.
27. Yin H, Liu G, Luo J, et al. Observation on the schizont stage of an unidentified *Theileria* sp. in experimentally infected sheep. *Parasitol Res* 2003; 91(1): 34-39.
28. Uilenberg G, Andreasen MP. *Haematoxenus separatus* sp. n. (Sporozoa, Theileriidae) a new blood parasite of domestic sheep in Tanzania. *Rev'Elevage Med veterinaire Pais tropicaux* 1974; 27: 459-465

29. Bhattacharyulu SD, Dhar S, Gautam OP, Malik PD. Experimental transmission of theileriosis in sheep, a preliminary report. HAU J Res 1973; 2(3): 202-206.
30. Soulsby E.J.L. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. London: Bailliere Tindall, 1986.
31. Salih DA, ElHusseini AM, Hayat M, Taha KM. Survey of *Theileria lestoquardi* antibodies among Sudanese sheep. Vet Parasitol 2003; 111(4): 361-7.
32. Sisodia RS, Gautam OP. Experimental cases of *Theileria hirci* infection in sheep and goats. Ind J Anim Sci 1983; 53: 162-166.
33. El-Azazy OME, El-Metenawy TM, Wassef HY. *Hyalomma impeltatum* (Acari: Ixodidae) as a potential vector of malignant theileriosis in sheep in Saudi Arabia. Vet Parasitol 2001; 99: 305–309
34. Razmi GR, Hosseini M, Aslani MR. Identification of tick vectors of ovine theileriosis in an endemic region of Iran. Vet Parasitol 2003; 116(1): 1-6.
35. Li Y, Luo J, Liu Z, et al. Experimental transmission of *Theileria* sp. (China 1) infective for small ruminants by *Haemaphysalis longicornis* and *Haemaphysalis qinghaiensis*. Parasitol Res 2007; 101: 533-538.
36. Li Y, Luo J, Guan G, et al. Experimental transmission of *Theileria uilenbergi* infective for small ruminants by *Haemaphysalis longicornis* and *Haemaphysalis qinghaiensis*. Parasitol Res 2009; 104: 1227-1231.
37. Yin H, Luo J, Guan G, et al. Experiments on transmission of an unidentified *Theileria* sp. to small ruminants with *Haemaphysalis qinghaiensis* and *Hyalomma anatolicum anatolicum*. Vet Parasitol 2002; 108: 21-30.
38. Mehlhorn H, Schein E, Warnecke M. Electron-microscopic studies on *Theileria ovis* Rodhain, 1916. Development of kinets in the gut of vector tick, *Rhipicephalus evertsi evertsi* Neumann, 1897 and their transformation within cells of salivary glands. J Protozool 1979; 26(3): 377-385.
39. Gill HS, Bhattacharyulu Y, Gill BS. Attempts to transmit *Theileria ovis* through the ticks *Haemaphysalis bispinosa* and *Rhipicephalus haemaphysalis*. Trop Anim Health Prod 1980; 12(1): 61.

40. Lewis D, Purnell R E, Bevan, W. J. The piroplasm *Theileria ovis* detected in sheep in South Wales. *Vet Rec* 1981; 108: 56-57.
41. Li Y, Guan G, Ma M, et al. *Theileria ovis* discovered in China. *Exp Parasitol* 2011; 127(1): 304-307.
42. Aktas M, Altay K, Dumanli N. PCR-based detection of *Theileria ovis* in *Rhipicephalus bursa* adult ticks. *Vet Parasitol* 2006; 140: 259-263.
43. Alani AJ, Herbert IV. Morphology and transmission of *Theileria recondita* (Theileriidae: Sporozoa) isolated from *Haemaphysalis punctata* from North Wales. *Vet Parasitol* 1988; 28: 283–291
44. Kuttler KL. Worldwide impact of babesiosis. In: Babesiosis of Domestic Animals and Man, Ristic M.(Editors). CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida. 1988: pp. 1-22.
45. Babes V. Sur l'hémoglobinurie bactérienne du bœuf. *CR. Acad Sci* 1888; 107: 692-694.
46. Smith T, Kilborne FL. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever, 8th and 9th Repts. *Bur Anim Industr U.S. Dep. Agric* 1893; 177–304.
47. Starcovici C. Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krakheiten, die seuchenhafte Hämoglobinurie des Rindes (Babes), dans Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). *Zbl Bakt I Abt* 1893; 14: 1–8.
48. Alani AJ, Herbert IV. The morphometrics of *Babesia motasi* (Wales) and its transmission by *Haemaphysalis punctata* (Canestrni and Fanzago, 1877) to sheep. *Vet Parasitol* 1988; 30: 87-95.
49. Uilengberg G, Rombach MC, Perie NM, Zwart D. Blood parasites of sheep in the Netherlands. II. *Babesia motasi* (Sporozoa, Babesiidae). *Veterinary Quarterly* 1980; 2: 3–14.
50. Hashemi-Fesharki R, Uilenburg G. *Babesia crassa* n.sp. (Sporozoa, Babesiidae) of domestic sheep in Iran. *Vet Quart* 1981; 2: 3-14.
51. Sarwar SM. A hitherto undescribed piroplasm of goats (*Piroplasma taylori*). *J Vet Sci Anim Husb* 1935; 5: 171-176.
52. Ray HN, Raghavachari K. Observations on *Babesia foliata* n.sp. from a sheep. *Indian Vet J* 1941; 11: 239–242.
53. Uilenburg G. Babesiosis. In: Sevicer MW (Editor). *Encyclopedia of Arthropod-Transmitted Infections of Man and Domasticated Animals*. Wallingford: CABI Publishing, 2001.

54. Mahoney DF. *Babesia* of domestic animals. In: Kreier JP. (Editor). Parasitic Protozoa Newyork: Academic Pres 1977: 1-52.
55. Mehlborn H. Cellular Organisation of Parasite Protozoa. In: Stephen H, Gillespie and Dickson D Topley and Wilson (Editors). Microbiology and Microbial Infections. Parasitology. Despommier: ASM Press, 2005.
56. Wenyon CM. Protozoology, A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists. Vol II, New York: Hafner Publish Co, 1965.
57. Friedhoff K.T. Transmission of *Babesia*. In: M. Ristic, (Editor). Babesiosis of domestic animals and man. Florida: Boca Raton 1988: 23–52.
58. Kreier JP, Baker JR. Parasitic Protozoa. Boston: Allen and Unwin Inc, 1987.
59. Purnell RE. Babesiosis in Various Hosts. In: Ristic M, Kreier JP (Editors). Babesiosis. New York: Academic Press 1981.
60. Friedhoff KT, Smith RD. Transmission of *Babesia* by ticks. In: Ristic, M, Kreier JP (Editors). Babesiosis, New York: Academic Press 1981.
61. Göksu K. *Rhipicephalus bursa* Canestrini ve Fanzago, 1877 (Acarina: Ixodoidae)'nın saha ve laboratuvar şartlarında biyo-ekolojisi üzerinde araştırmalar. AÜ Vet Fak Derg 1969; 16(4): 295-312.
62. Yeruham I, Hadani A, Galker F. Some epizootiological and clinical aspects of ovine babesiosis caused by *Babesia ovis*. A review. Vet Parasitol 1998; 74, 153–163.
63. Nagore D, García-Sanmartín J, García-Pérez AL, Juste RA, Hurtado A. Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in a sheep population from Northern Spain. Int J Parasitol 2004; 34: 1059–1067.
64. 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.
65. Liu AH, Yin H, Guan GQ, et al. At least two genetically distinct large *Babesia* species infective to sheep and goats in China. Vet Parasitol 2007; 147: 246–251.
66. Niu Q, Luo J, Guan G, et al. Differentiation of two ovine *Babesia* based on the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences. Exp Parasitol 2009; 121: 64–68

67. Oosthuizen MC, Zwegarth E, Collins NE, Troskie M, Penzhorn BL. Identification of a novel *Babesia* sp. from a sable antelope (*Hippotragus niger* Harris, 1838). *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2247–2251.
68. Jouglin M, Fernández-de-Mera IG, delaCotte N, et al. Isolation and characterization of *Babesia pecorum* sp. nov. from farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Vet Res* 2014; 45: 78.
69. Bosman AM, Oosthuizen MC, Peirce MA, Venter EH, Penzhorn BL. *Babesia lengau* sp. nov., a novel *Babesia* species in cheetah (*Acinonyx jubatus*, Schreber, 1775) populations in South Africa. *J Clin Microbiol* 2010; 48(8): 2703-8.
70. Bosman AM, Oosthuizen MC, Venter EH et al. *Babesia lengau* associated with cerebral and haemolytic babesiosis in two domestic cats. *Parasit Vectors* 2013; 1(6): 128.
71. Giadinis ND, Chochlakis D, Kritsepi-Konstantinou M, et al. Haemolytic disease in sheep attributed to a *Babesia lengau*-like organism. *Vet Rec* 2012; 170(6): 155.
72. Bai Q, Liu GY, Liu DK, Ren JX, Li X. Isolation and preliminary characterization of a large *Babesia* sp. from sheep and goats in the eastern part of Gansu Province, China. *Parasitol Res* 2002; 88: 16-21.
73. Guan GQ, Ma ML, Moreau E, et al. A new ovine *Babesia* species transmitted by *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Exp Parasitol* 2009; 122: 261-267.
74. Guan GQ, Yin H, Luo JX, et al. Isolation of a large ovine *Babesia* sp. in Xinjiang, China (in Chinese). *Chin J Vet Sci Technol* 2001; 31: 35-36.
75. Brown CG, Ilhan T, Kirvar E, et al. *Theileria lestoquardi* and *T. annulata* in cattle, sheep, and goats. In vitro and in vivo studies. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 849: 44-51.
76. Taha K.M. Experimental transmission of *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* (Apicomplexa: Theileridae) and their cross transmission between cattle and sheep. PhD Thesis. Sudan Academy of Science, 2009.
77. Leemans I, Brown D, Fossum C, et al. Infectivity and cross-immunity studies of *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in sheep and cattle: II. In vitro studies. *Vet Parasitol* 1999; 82: 193-204.

78. Leemans I, Brown D, Hooshmand-Rad P, Kirvar E, Uggla A. Infectivity and cross-immunity studies of *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in sheep and cattle: I. In vivo responses. *Vet Parasitol* 1999; 82: 179-192.
79. Taha KM, Salih DA, Ali AM, Omer RA, El Hussein AM. Naturally occurring infections of cattle with *Theileria lestoquardi* and sheep with *Theileria annulata* in the Sudan. *Vet Parasitol* 2013; 191(1-2): 143-5.
80. Bigdeli M, Rafie SM, Namavari MM, Jamshidi S. Report of *Theileria annulata* and *Babesia canis* infections in dogs. *Comp Clin Pathol* 2012; 21: 375–7.
81. Aktas M, Özübek S, Altay K, et al. Molecular detection of tick-borne rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. *Parasit Vectors*. 2015; 8: 157.
82. Beck R, Vojta L, Mrljak V, et al. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int J Parasitol* 2009; 39: 843–848.
83. Hamel D, Silaghi C, Lescai D, Pfister K. Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp.. *Parasitol Res* 2012; 110: 1537–1545.
84. Gabrielli S, Otašević S, Ignjatović A, et al. Canine Babesioses in Noninvestigated Areas of Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2015; 15(9): 535-8.
85. Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Sarana A, Barba-Carretero J.C. Presence of *Mycoplasma hemofelis*, *Mycoplasma hemominutum* and piroplasmids in cats from Southern Europe: a molecular study. *Vet Microbiol* 2003; 93, 307–317.
86. André MR, Herrera HM, de Jesus Fernandes S, et al. Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 2015; 6(6): 779-86.
87. Pietrobelli M, Cancrini G, Moretti A, Tampieri M. Animal babesiosis an emerging zoonosis also in Italy? *Parassitologia* 2007; 49 (Suppl. 1), 33–38.
88. Sivakumar T, Lan DT, Long PT, et al. PCR detection and genetic diversity of bovine hemoprotozoan parasites in Vietnam. *J Vet Med Sci* 2013; 75: 1455–62.
89. Elsify A, Sivakumar T, Nayel M, et al. An epidemiological survey of bovine *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle, buffaloes, and sheep in Egypt. *Parasitol Int* 2015; 64(1): 79-85.

90. Wiegmann L, Silaghi C, Obiegala A, et al. Occurrence of *Babesia* species in captive reindeer (*Rangifer tarandus*) in Germany. *Vet Parasitol* 2015; 211(1-2): 16-22.
91. Norval RAI, Perry BD, Young AS. *The Epidemiology of Theileriosis in Africa*. Academic Pres, London, 1992.
92. Tageldin MH, Zahia AM, Nagma ZG, El Savi SAS. An outbreak of theileriosis in sheep in Sudan. *Trop Anim Health Prod* 1992; 24: 15-16.
93. Vashishta MS, Mathur PD, Goswami SK. Fatal goat theileriosis in India. *Ind J Anim Health* 1987; 26(1): 61-62.
94. Al-Amery MAY, Hasso SA. Laboratory diagnosis of novel species of *Theileria hirci*, *Eimeria caprovina* and *Eimeria pallida* in goats in Iraq. *Small Rum Res* 2002; 44: 163-166.
95. Jalali SM, Khaki Z, Kazemi B, et al. Molecular Detection and Identification of *Theileria* Species by PCR-RFLP Method in Sheep from Ahvaz, Southern Iran. *Iran J Parasitol* 2014; 9(1): 99-106.
96. Heidarpour Bami M, Haddadzadeh HR, Kazemi B, et al. Molecular identification of ovine *Theileria* species by a new PCR-RFLP method. *Vet Parasitol*. 2009; 161(3-4): 171-7.
97. Esmaeilnejad B, Tavassoli M, Asri-Rezaei S, et al. Determination of Prevalence and Risk Factors of Infection with *Babesia ovis* in Small Ruminants from West Azerbaijan Province, Iran by Polymerase Chain Reaction. *J Arthropod Borne Dis* 2015; 9(2): 246-52.
98. Zaeemi M, Haddadzadeh H, Khazraiiinia P, Kazemi B, Bandehpour M. Identification of different *Theileria* species (*Theileria lestoquardi*, *Theileria ovis*, and *Theileria annulata*) in naturally infected sheep using nested PCR-RFLP. *Parasitol Res* 2011; 108(4): 837-43.
99. Fakhari M, Hajihasani A, Maroufi S, et al. An epidemiological survey on bovine and ovine babesiosis in Kurdistan Province, western Iran. *Trop Anim Health Prod* 2012; 44(2): 319-22.
100. Ranjbar-Bahadori S, Eckert B, Omidian Z, Shirazi NS, Shayan P. *Babesia ovis* as the main causative agent of sheep babesiosis in Iran. *Parasitol Res* 2012; 110(4): 1531-6.
101. Rashidi A, Razmi G. Molecular detection of *Theileria* spp. in sheep and vector ticks in the North Khorasan Province, Iran. *Trop Anim Health Prod* 2013; 45(1): 299-303.
102. Khodaveisi M, Rahbari S, Shayan P, Hoghooghi Rad N. Molecular detection of *Theileria ovis* in goat in Tehran province, Iran. *Res. Opin. Anim. Vet. Sci* 2015; 5(12): 489-493.

103. Renneker S, Abdo J, Bakheit MA et al. Coinfection of sheep with *Anaplasma*, *Theileria* and *Babesia* species in the Kurdistan Region, Iraq. *Transbound Emerg Dis* 2013; 2: 113-8.
104. A'aiz NN, Dhaim YA. Prevalence of Theileriosis in sheep in Al-Kut province in Iraq. *International Journal of Advanced Research* 2014; 2(3): 514-519.
105. Saeed S, Jahangir M, Fatima M, et al. PCR based detection of *Theileria lestoquardi* in apparently healthy sheep and goats from two districts in Khyber Pukhtoon Khwa (Pakistan). *Trop Biomed* 2015; 32(2): 225-32.
106. Shahzad W, Noor H, Ahmad MU, et al. Prevalence and Molecular Diagnosis of *Babesia ovis* and *Theileria ovis* in Lohi Sheep at Livestock Experiment Station (LES), Bahadurnagar, Okara, Pakistan. *Iran J Parasitol* 2013; 8(4): 570-8.
107. Fatima M, Saeed S, Shaikh RS, Ali M, Iqbal F. A Study on Molecular Detection of *Theileria lestoquardi* by PCR Amplification in Apparently Healthy Small Ruminants from Five Districts of Southern Punjab. *Pakistan J Zool* 2015; 47(2): 441-446.
108. Iqbal F, Khattak R, Ozubek S, et al. Application of the Reverse Line Blot Assay for the Molecular Detection of *Theileria* and *Babesia* sp. in Sheep and Goat Blood Samples from Pakistan. *Iran J Parasitol* 2013; 8 (2): 289-95.
109. Iqbal F, Fatima M, Shahnawaz S, et al. A study on the determination of risk factors associated with babesiosis and prevalence of *Babesia* sp., by PCR amplification, in small ruminants from Southern Punjab (Pakistan). *Parasite* 2011; 18(3): 229-34.
110. Durrani S, Khan Z, Khattak RM, et al. A comparison of the presence of *Theileria ovis* by PCR amplification of their SSU rRNA gene in small ruminants from two provinces of Pakistan. *Asian Pac J Trop Dis* 2012; 43-47.
111. Durrani AZ, Younus M, Kamal M, Mahmood N, Shakoori AR. Prevalence of Ovine *Theileria* Species in District Lahore, Pakistan. *Pak J Zool* 2011; 43(1): 57-60.
112. Li Y, Zhang X, Liu Z, et al. An epidemiological survey of *Theileria* infections in small ruminants in central China. *Vet Parasitol* 2014; 200(1-2): 198-202
113. Niu Q, Luo J, Guan G, et al. Detection and differentiation of ovine *Theileria* and *Babesia* by reverse line blotting in China. *Parasitol Res* 2009; 104(6): 1417-23.

114. Li Y, Guan G, Ma M, et al. *Theileria ovis* discovered in China. *Exp Parasitol* 2011; 127(1): 304-7.
115. Cao S, Zhang S, Jia L et al. Molecular detection of *Theileria* species in sheep from northern China. *J Vet Med Sci* 2013; 75(9): 1227-30.
116. Tian Z, Liu G, Yin H, et al. First report on the occurrence of *Theileria* sp. OT3 in China. *Parasitol Int* 2014; 63(2): 403-7.
117. Charyev O. Morphology and biology of Piroplasm in sheep and ticks. *Izvestiya Akademi Nauk Turkmenistana Seriya Biology Cheskih Nauk* 1992; 4: 78-80.
118. Sisodia RS, Mandial RK. Management of clinical cases of theileriosis in field in cattle and sheep with special reference to current concept of therapy. *Prevention and Control Veterinary* 1987; 1(1): 7-11.
119. Mazyad SA, Khalaf SA. Studies on *Theileria* and *Babesia* infecting live and slaughtered animals in Al Arish and El Hasanah, North Sinai Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 2002; 32(2): 601-610.
120. Papadopoulos B, Brossard M, Perie NM. Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece. 3. Piroplasms of small ruminants. *Vet Parasitol* 1996; 63(1-2): 67-74.
121. Ferrer D, Castella J. Seroprevalence of *Theileria ovis* in small ruminants in north-east Spain determined by the indirect fluorescent antibody test. *Vet Rec* 1999; 145(12): 346-347.
122. Alyasino Y, Greiner M. Serosurvey on theileriosis in Awassi sheep in Syria. *Vet Parasitol* 1999; 81: 275-280.
123. Göksu K. Yerli koyunlarımızda Babesidae ve Theileridae'lerin epizootiolojik durumları ile biolojilerine dair araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 1967.
124. İnci A, Karaer Z, İça A. Kayseri yöresinde koyun ve keçilerde babesiosis. *F Ü Sağ Bil Vet Derg* 2002; 16(1): 79-83.
125. İnci A, Nalbantoğlu S, Çam Y ve ark. Kayseri yöresinde koyun ve keçilerde theileriosis ve kene enfestasyonları. *Turk J Vet Anim Sci* 2003; 27: 57-60.
126. Sayın F, Nalbantoğlu S, Yukarı BA, Çakmak A, Karaer Z. Epidemiological studies on sheep and goat *Theileria* infection. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2009; 56: 127-129.

127. İnci A, Yukarı BA, Sayın F. Çankırı yöresinde bazı koyun ve keçi sürülerinde babesiosis ve theileriosis etkenlerinin mikroskopik kan muayenesiyle araştırılması Ankara Üniv Vet Fak Derg 1998; 45: 105-113.
128. Özkoç Ü. Koyunlarda *Babesia ovis* (Babes, 1892) enfeksiyonunun indirek floresan antikor tekniği ile serolojik teşhisi üzerine araştırma. Pendik Vet Kont Araş Enst Derg 1979; 11: 70-83.
129. Aktaş M, Düzgün A, Babür C. Seroprevalence of *Babesia ovis* in Malatya. Turk J Vet Anim Sci 2001; 25: 241-243.
130. Çiçek H, Düzgün A, Emre Z, Karaer Z. Seroprevalance of *Babesia ovis* in sheep around Afyon. Turk J Vet Anim Sci 2004; 28: 683-686.
131. Sevinç F, Dik B. Konya yöresindeki koyunlarda *Babesia ovis*'in ELISA ile teşhisi. Veteriner Bilimleri Dergisi 1996; 12(2): 73-79.
132. Emre Z, Düzgün A, İriadam M, Sert H. Seroprevalence of *Babesia ovis* in Awassi sheep in Urfa, Turkey. Turk J of Vet Anim Sci 2001; 25(5): 759-762.
133. Değer S. Van ilinde koyunlarda babesiosisin seroepidemiolojisi üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1990.
134. Duzgun A, Wright IG, Waltisbuhl DJ, et al. An ELISA for the diagnosis of *Babesia ovis* infection utilizing a synthetic, *Babesia bovis*-derived antigen. Vet Parasitol 1991; 39: 225-231.
135. Yukarı BA, Çakmak A, Karaer Z, Düzgün A, Yaralı C. Ankara yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*'in IFA ve ELISA yöntemleri ile serodiagnozu. Vet Hek Dern Derg 1996; 67: 42-45.
136. Duzgun A. Çanakkale yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*'in seroepidemiolojisi. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1997.
137. Çakmak A, İnci A, Karaer Z. Çankırı yöresindeki koyun ve keçilerde *Babesia ovis*'in seroprevelansı. T Parazitol Derg 1998; 22: 73-76.
138. Karatepe M. Niğde Yöresinde *Babesia ovis*'in Seroprevelansı Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2001.
139. Karatepe M, Karatepe B, Çakmak A, Nalbatoğlu S. Niğde yöresinde koyun ve keçilerde *Babesia ovis*'in prevelansı. Türkiye Parazitol Derg 2003; 27: 18-20.
140. Dumanlı N, Köroğlu E, Düzgün A, Angın M, Küçüklerden N. Elazığ yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*'in seroprevelansı. Turk J Vet Anim Sci 1997; 21: 183-186.

141. akmak A, Dinçer Ő, Karaer Z. Samsun yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*'in serodiagnozu üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 38: 242-251, 1991.
142. Karatepe M, Karatepe B, Duzgun A, Cicek H. Ovine babesiosis in the Amasya province, Turkey. Indian Vet J 2005; 82: 248-250.
143. Sayın F, Dinçer Ő, Karaer Z ve ark. Status of tick infestation of sheep and goats in Turkey. Parassitologia 1997; 39, 145-152.
144. Sevinç F, Uslu U, Dik B, Gökçen A, Altınz F. Konya yresi keilerinde *Babesia ovis*'in IFA (İndirekt Floresan Antikor) testi ile teşhisi. Türkiye Parazitol Derg 2000; 24: 172-175.
145. Yağcı S, akmak A. *Babesia ovis* in goat. Indian Vet J 2005, 82: 933-934.
146. Gzel M, Yaman M, Babr C. ve ark. Seroprevalance of toxoplasmosis and babesiosis in shami goats. Indian Vet J 2007, 84: 241-242.
147. Ahmed J, Yin H, Schnittger L, Jongejan F. Ticks and tick-borne diseases in Asia with special emphasis on China. Parasitol Res 2002; 88: 51-5.
148. Gao YL, Yin H, Luo JX, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Theileria* sp. infection in sheep. Parasitol Res 2002; 88: 8-10.
149. Brown CG. Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle. Parassitologia 1990; 32(1): 23-31.
150. Gubbels MJ, d'Oliveira C, Jongejan F. Development of an indirect Tamsl enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7: 404-411.
151. Burridge MJ, Brown CG, Kimber CD. *Theileria annulata*: cross-reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. Exp Parasitol 1974; 35(3): 374-380.
152. Mosqueda J, Olvera-Ramirez A, Aguilar-Tipacamu G, Canto GJ. Current advances in detection and treatment of babesiosis. Curr Med Chem 2012; 19(10):1504-18.
153. Aktas M, Altay K, Dumanli N. Survey of *Theileria* parasites of sheep in eastern Turkey using polymerase chain reaction. Small Ruminant Res. 2005; 60: 289-293.

154. Aktas M, Altay K, Dumanli N. Determination of prevalence and risk factors for infection with *Babesia ovis* in small ruminants from Turkey by polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 2007; 100(4): 797-802.
155. Altay K, Aktas M, Dumanli N. *Theileria* infections in small ruminants in the east and southeast Anatolia. *Turkiye Parazitoloj Derg* 2007; 31(4): 268-271.
156. O'Sullivan MV, Zhou F, Sintchenko V, Kong F, Gilbert GL. Multiplex PCR and reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB). *J Vis Exp* 2011; (54). pii: 2781.
157. Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, et al. Diagnosis of Sickle Cell Anemia and β -Thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 1988; 319: 537-541.
158. Kaufhold A, Podbielski A, Baumgarten, G, et al. Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. *FEMS microbiology letters* 1994; 119(1-2): 19-25.
159. 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.
160. 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.
161. 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.
162. Schnittger L, Yin H, Jianxun L, et al. Ribosomal small-subunit RNA gene-sequence analysis of *Theileria lestoquardi* and a *Theileria* species highly pathogenic for small ruminants in China. *Parasitol Res* 2000; 86(5): 352-8.
163. İa A, Yıldırım A, İnci A. Kayseri y6resinde koyunlarda kan protozoonlarının Reverse Line Blotting Y6ntemi ile Araştırılması. XIV Ulusal Parazitoloji Kongresi, 2005, Dokuz Eyl6l 6niversitesi İzmir.

164. Saraylı H, İnci A, İca A, Yıldırım A, Düzlü Ö. Yeşilhisar yöresindeki koyun ve keçilerde *Babesia* etkenlerinin Reverse Line Blotting (RLB) yöntemiyle araştırılması. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2006; 15(3): 181-188.
165. Duzlu O, Yıldırım A, İnci A, Kocabeyoğlu ZE. Investigation of *Babesia* and *Theileria* species in goats by reverse line blotting and microscopic examination around Kahramanmaraş province, Turkey. The 4th Asean Congress of Tropical Medicine and Parasitology, 2-4 June, Singapore.
166. İnci A, İca A, Yıldırım A, Düzlü Ö. Identification of *Babesia* and *Theileria* species in small ruminants in Central Anatolia (Turkey) via reverse line blotting. Turk J Vet Anim Sci 2010; 34(2): 205-210.
167. Aydın MF, Aktas M, Dumanlı N. Molecular identification of *Theileria* and *Babesia* in sheep and goats in the Black Sea Region in Turkey. Parasitol Res 2013; 112(8): 2817-24.
168. Altay K, Dumanlı N, Aktas M. A study on ovine tick-borne hemoprotozoan parasites (*Theileria* and *Babesia*) in the East Black Sea Region of Turkey. Parasitol Res 2012; 111(1): 149-53.
169. Açıcı M, Umur Ş, Kurt M, Beyhan YE, Pekmezci GZ. Orta Karadeniz bölgesi ve Sivas yöresi sığır ve koyunlarında kan parazitlerinin retrospektif incelenmesi. 15. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 2007, Kayseri ve Ürgüp.
170. Oğuz B, Sona A, Kılıç Ö, ve ark. Van ve yöresinde koyun ve keçilerde babesiosis ve vektör kenelerin epidemiyolojisi. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 2013, Denizli.
171. Orkun Ö, Karaer Z, Çakmak A, Nalbantoğlu S. Identification of tick-borne pathogens in ticks feeding on humans in Turkey. PLoS Negl Trop Dis 2014; 8(8): e3067.
172. Aktas M. A survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens. Vet Parasitol 2014; 200(3-4): 276-83.
173. <http://www.cografya.gen.tr/05.12.2015>
174. Estrada-Pena A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: a guide to identification of species. First Edition. Published by University of Zaragoza, Spain: 2004, 131.
175. Adamu M, Troskie M, Oshadu DO, et al. Occurrence of tick-transmitted pathogens in dogs in Jos, Plateau State, Nigeria. Parasit Vectors 2014; 7: 119.

176. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(14): 3059-66.
177. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993; 10: 512-526.
178. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30: 2725-2729.
179. Paparini A, Ryan U, Warren K, McInnes L, Tores P, Irwin P. Identification of novel *Babesia* and *Theileria* genotypes in the endangered marsupials, the woylie (*Bettongiapenicillataogilbyi*) and boodie (*Bettongialesueur*). *Exp Parasitol* 2012; 131(1): 25-30.
180. Allsopp B, Baylis H, Allsopp M, et al. Discrimination between six species of *Theileria* using oligonucleotide probes which detect small subunit ribosomal rna sequences. *Parasitology* 1993; 107: 157-165.
181. Allsopp MT, Cavalier-Smith T, De Waal DT, Allsopp BA. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology* 1994; 108: 147-152.
182. Aktas M, Özübek S. Bovine anaplasmosis in Turkey: First laboratory confirmed clinical cases caused by *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Microbiol* 2015; 78: 246-251.
183. 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): 223-38.
184. Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Saraña A, Barba-Carretero JC. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet Parasitol* 2003; 114(3): 173-94.
185. Uilenberg G, Goff WL. Polyphasic taxonomy. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1081: 492-7.
186. Aktas M, Ozubek S. Molecular and parasitological survey of bovine piroplasms in the Black Sea Region, including the first report of Babesiosis associated with *Babesia divergens* in Turkey. *J Med Entomol* 2015; 52(6): 1344-50.

187. Silaghi C, Hamel D, Pfister K, Rehbein S. *Babesia* species and co-infection with *Anaplasma phagocytophilum* in free-ranging ungulates from Tyrol (Austria). *Wien. Tierärztliche Mschr. – Vet Med Austria* 2011; 98: 268–274.
188. Robert N, Hoby S, Mathis A, Deplazes P, Wenker C. Fatal babesiosis caused by *Babesia* sp. EU1 in a reindeer at the Zoo Basel, Switzerland. In: European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZWV). Seventh Scientific Meeting, Leipzig 2008. Oral Presentation.
189. Overzier E, Pfister K, Herbb I, et al. Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), in questing ticks (*Ixodes ricinus*), and in ticks infesting roe deer in southern Germany. *Ticks Tick Borne Dis* 2013; 4: 320–328.
190. Michel A.O, Mathis A, Ryser-Degiorgis, MP. *Babesia* spp. in European wild ruminant species: parasite diversity and risk factors for infection. *Vet Res* 2014; 45: 65.
191. Kik M, Nijhof AM, Balk JA, Jongejan, F. *Babesia* sp. EU1 infection in a forest reindeer, the Netherlands [letter]. *Emerg Infect Dis* 2011; 17 (5),936–938.
192. Emerson HR, Wright WT. The isolation of a *babesia* in white-tailed deer. *Wildl Dis* 1968; 4(4): 142.
193. Pattullo KM, Wobeser G, Lockerbie BP, Burgess HJ. *Babesia odocoilei* infection in a Saskatchewan elk (*Cervus elaphus canadensis*) herd. *J Vet Diagn Invest* 2013; 25(4): 535-40.
194. Waldrup, KA. The involvement of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in the epidemiology of bovine *Babesia bovis* infection in Texas. PhD dissertation, Texas A&M University, College Station, Texas, 1991, 196 pp.
195. Tanyel E, Guler N, Hokelek M, Ulger F, Sunbul M. A case of severe babesiosis treated successfully with exchange transfusion. *Int J Infect Dis* 2015; 38: 83-5.
196. Jiang JF, Li H, Cao WC. Epidemiological profile of "*Babesia venatorum*"--authors' reply. *Lancet Infect Dis*. 2015; 15(8): 878.
197. Wang F, Li O, Li W, etl al. Investigation on the *Theileria hirci* infection in Huangyuan, Menyuan and Jianzha counties (in Chinese). *Newsl Vet Med Anim Husb (Qinghai)* 1980; 3: 29–32.
198. Ahmed JS, Luo J, Schnittger L, et al. Phylogenetic position of small-ruminant infecting piroplasm. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1081: 498-504.

199. Steuber S, Frevert U, Ahmed JS, Hauschild S, Schein E. In vitro susceptibility of different mammalian lymphocytes to sporozoites of *Theileria annulata*. Z Parasitenkd 1986; 72: 831-834.
200. Li Y, Liu Z, Yang J et al. Infection of small ruminants and their red blood cells with *Theileria annulata* schizonts. Exp Parasitol 2014; 137: 21-4.
201. Kutsal T. Adana bölgesi koyun kan protozoonları. Etlik Vet Mikrob. Enst Derg 1977; 4: 11-12.
202. Hoffmann G, Hörchner F, Schein E, Garber H. Saisonales Auftreten von Zecken und Piroplasmen bei Haustieren in den asiatischen Provinzen der Türkei. Berl Münch Tierärztl Wschr 1971; 8: 152-156.
203. Bauman R. Die kleinasiatische Schaftheileriose. Berliner and Münchener Tierärztliche Wochenschrift 1939; 30: 469-474.
204. Theodoropoulos G, Gazouli M, Ikononopoulos JA, Kantzoura V, Kominakis A. Determination of prevalence and risk factors of infection with *Babesia* in small ruminants from Greece by polymerase chain reaction amplification. Vet Parasitol 2006; 135(2): 99-104.
205. Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR 3rd, Krause PJ, Persing DH. Babesiosis. Clin Microbiol Rev 2000; 13(3): 451-69.
206. Sayın F, Dumanlı N. Elazığ bölgesinde evcil hayvanlarda görülen kene (Ixodoidea) türleri ile ilgili epizootiyolojik araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1982; 29(3-4): 344-362.
207. Aydın L. Güney Marmara ruminantlarında görülen kene türleri ve yayılışları. Türkiye Parazitoloj Derg 2002; 24(2): 194-200.
208. Yukarı BA, Umur Ş. Burdur yöresindeki sığır, koyun ve keçilerde kene (Ixodoidea) türlerinin yayılışı. Turk J Vet Anim Sci 2002; 6, 1263-1270.
209. İnci A, Nalbantoğlu S, Çam Y ve ark. Kayseri yöresinde koyun ve keçilerde theileriosis ve kene enfestasyonları. Turk J Vet Anim Sci 2003; 27: 57-60.
210. Yeruham I, Hadani A, Galkner F, Rosen S. A study of an enzootic focus of sheep babesiosis (*Babesia ovis*, Babes, 1892). Vet Parasitol 1995; 60(3-4): 349-54.
211. Moltmann UG, Mehlhorn H, Friedhoff KT. Electron microscopic study on the development of *Babesia ovis* (Piroplasmia) in the salivary glands of the vector tick *Rhipicephalus bursa*. Acta Trop 1982; 39(1): 29-40.

212. 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): 116-9.

213. Shayan P, Hooshmand E, Rahbari S, Nabian S. Determination of *Rhipicephalus* spp. as vectors for *Babesia ovis* in Iran. Parasitol Res 2007;101(4): 1029-33.



8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sezayi ÖZÜBEK
Doğum Yeri ve Tarihi: ADANA/1987
Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti
Medeni Durumu: Evli
Adres: Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji
Anabilim Dalı, Elazığ
Telefon: 0424 237 00 00/3971- 0543 815 1946
E- posta: sozubek@firat.edu.tr; vetsezai@gmail.com

Eğitim Bilgileri

2011-2015 : F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Veteriner Programı-Elazığ
2005-2010 : Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi-Elazığ
2003-2004 : Girne Anafartalar Lisesi-KKTC
2001-2003 : Adana Paksoy Lisesi
1993-2001 : İsmet İnönü İlköğretim Okulu-Adana
Yabancı Dili : İngilizce

Mesleki deneyimi

2011-2012 : F.Ü Veteriner Fakültesi Parazitoloji A.D Doktora öğrencisi,
Elazığ
2011-2012 : Çemişgezek Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü Veteriner
Hekim, Tunceli
2012- : F.Ü Veteriner Fakültesi Parazitoloji A.D Araştırma Görevlisi,
Elazığ

Proje deneyimi

1. Kırım-Kongo kanamalı ateşi virüsünün epidemiyolojisi, moleküler karakterizasyonu, antijen elisa geliştirilmesi ve koruyucu aşı çalışmaları. TUBITAK KAMAG, 108G126, Bursiyer.
2. Adana, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illerinde koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin araştırılması. FÜBAP, VF-1420, Araştırmacı

Bilimsel yayınlar

1. Aktas M, **Ozubek S**. Molecular and parasitological survey of bovine piroplasms in the Black Sea Region, including the first report of babesiosis associated with *Babesia divergens* in Turkey. J Med Entomol 2015; 52(6): 1344-50.
2. Aktas M, **Ozubek S**. Bovine anaplasmosis in Turkey: First laboratory confirmed clinical cases caused by *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Microbiol 2015; 78: 246-251.
3. Aktas M, **Ozubek S**, Altay K, Balkaya I, Utuk AE, Kırbas A, Şimsek S, Dumanlı N. A molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* in domestic dogs in Turkey. Vet Parasitol 2015; 209 (3-4): 264-267.
4. Aktas M, **Ozubek S**, İpek NDS, Altay K, Balkaya I, Utuk AE, Kırbas A, Şimsek S, Dumanlı N. Molecular detection of tick-borne rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. Parasites & Vectors 2015; 8: 157.
5. Altay K, Dumanlı N, Aktaş M, **Ozubek S**. Survey of *Anaplasma* infections in small ruminants from east part of Turkey. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2014; 20(1): 1-4.
6. Aktas M, Vatansever Z, **Ozubek S**. Molecular evidence for trans-stadial and transovarial transmission of *Babesia occultans* in *Hyalomma marginatum* and *Rhipicephalus turanicus* in Turkey. Vet Parasitol 2014; 204(3-4): 369-71.
7. Iqbal F, Khattak RM, **Ozubek S**, Khattak MNK, Rasul A, Aktas M. Application of the reverse line blot assay for the molecular detection of *Theileria* and *Babesia*

sp. in sheep and goat blood samples from Pakistan. Iranian Journal of Parasitology 2013; 8(2): 289-295.

8. Aktas M, **Ozubek S**, Ipek DNS. Molecular investigations of *Hepatozoon* species in dogs and developmental stages of. Parasitol Res 2013; 112(6): 2381-2385.
9. 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. Vet Parasitol 2012; 187(3-4): 567-71.
10. Gunes N, Arsoy D, Aktas M, **Ozubek S**, Ozuicli M, Aydin L, Selcuk O. Changes in some biochemical parameters in small ruminant theileriosis. Bulg J Agric SCI, 22 (no 2) 2016, 303–307

Ulusal kongre, konferans ve sempozyumlardaki tebliğler

1. Aktas M, Çanakoğlu N, Berber E, **Ozubek S**, Yörük MD, Vatansever Z, Özdarendeli A. Endemik bölgede konak arayan kenelerde Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi virüsünün yaygınlığı. 4. Ulusal Viroloji Kongresi, 23-26 Haziran 2011, Dedeman Hotel İstanbul.
2. Güven E, Deniz A, Gündüz N, **Ozubek S**, Kar S, Aktaş M, Vatansever Z. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalığının endemik olduğu bir bölgede kene popülasyonunu kontrol amacıyla sığırlarda %1 Flumethrin uygulanmasının etkinliği. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 29 Eylül- 5 Ekim 2013 Denizli.
3. **Ozubek S**, Aktas M. Adana, Mersin, Gaziantep ve Adyaman illerinde Koyun ve Keçilerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin Araştırılması. 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu. 5-9 Ekim 2015 Erzurum.
4. **Ozubek S**, Aktas M. Sığırlarda babesiosis. 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu. 5-9 Ekim 2015 Erzurum.
5. **Ozubek S**, İpek D.N.S, Aktas M. Kenelerde *Hepatozoon canis* ookistinin mikroskopik görünümü. 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu. 5-9 Ekim 2015 Erzurum.

Uluslararası Kongre, Konferans ve Sempozyumlardaki Tebliğler

1. Aktas M, Vatansever Z, Çanakoğlu N, Berber E, **Ozubek S**, Kalkan A, Özdarendeli A. Crimean-Congo hemorrhagic fever infection prevalence in field collected ticks in endemic areas of Turkey. Xth European Congress of Entomology, 3-8 August 2014, University of York, York, UK.
2. Aktas M, **Ozubek S**, İpek DNS. Molecular investigations of *Hepatozoon* species in dogs and developmental stages of. Conference of the Society for Tropical Veterinary Medicine Hosted by Faculty of Veterinary Medicine, Kasart University, STVM Phuket, Thailand, June 18-21, 2012.
3. Altay K, Dumanlı N, Aktas M, **Ozubek S**. Molecular survey of *Anaplasma ovis* and *Anaplasma phagocytophilum* in sheep and goats in the east of Turkey. Seventh Ticks and Tick-borne Pathogens International Conference. 28 August-02 September 2011. Zaragoza, Spain.
4. Aktas M, Vatansever Z, Çanakoğlu N, Berber E, **Ozubek S**, Kalkan A, Özdarendeli A. Crimean-Congo hemorrhagic fever infection prevalence in field collected ticks in endemic areas of Turkey. 5th European Congress of Virology, September 11-14 2013, Lyon France.
5. Aktas M, **Ozubek S**, Molecular detection of *Hepatozoon* species in Ixodid ticks from Turkey. 31st World Veterinary Congress, 150th Anniversary of the World Veterinary Association Prague, Czech Republic, 17-20 September 2013