

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

**DOĞU ve GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGELERİNDE
KOYUN ve KEÇİ THEİLERİOSİSİNİN
MİKROSKOPİK ve MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**KÜRŞAT ALTAY
ELAZIĞ-2006**

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Necip İLHAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Edip ÖZER
Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Münir AKTAŞ

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Edip ÖZER

Prof. Dr. Zafer KARAER

Prof. Dr. Nazir DUMANLI

Doç. Dr. Münir AKTAŞ

Doç. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

TEŞEKKÜR

Araştırma boyunca bana yol gösteren ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Münir AKTAŞ'a, bilimsel alanda çaba ve azmini örnek aldığım, yakın ilgi ve desteğini gördüğüm tez ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nazir DUMANLI'ya ve çalışmalarım sırasında devamlı olarak bilgilerinden yararlandığım Sayın Doç. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ'ye teşekkürü bir borç bilirim. Bu araştırmaya başlamadan önce yapılan ön çalışmalarda, örneklerin sekanslanmasına ve spesifik primelerin dizayn edilmesine katkı sağlayan Sayın Dr. Patricia Holman'a, PCR metodunun spesifikite testlerinde kullanılan pozitif kontrol DNA'ları gönderen Sayın Dr. Jabbar Ahmed'e, Sayın Dr. Dirk Geysen'e ve Sayın Dr. Sonia Almeria de la Merced'e, saha çalışmaları sırasında hiçbir özveriyi esirgemeyen Malatya, Muş, Erzincan, Erzurum, Iğdır, Diyarbakır, Mardin İl ve İlçe Tarım Müdürlükleri ile Hayvan Sağlık Şube Müdürlüklerinde görevli Veteriner Hekim ve Veteriner Sağlık Teknisyenlerine, bölgedeki hayvan yetiştiricilerine teşekkür ederim.

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK, VHAG-2119) ve Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (FÜBAP, 1031) tarafından desteklenmiştir. Çalışmaya sağlamış oldukları maddi destekten dolayı TÜBİTAK ve FÜBAP kurumlarına teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u> <u>No</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	5
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
4.1. Saha Çalışmaları.....	18
4.1.1. Numunelerin Toplanması.....	19
4.2. Laboratuvar Çalışmaları.....	20
4.2.1. DNA Ekstraksiyonu.....	22
4.2.2. <i>Theileria ovis</i> ve <i>Theileria lestoquardi</i> Primerleri.....	22
4.2.3. PCR ve PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi.....	24
4.2.4. Kontrol DNA Örnekleri.....	26
4.2.5. <i>Theileria ovis</i> Primerlerinin Spesifitesi ve Sensitivitesinin Belirlenmesi.....	27
4.2.6. PCR’da Kullanılan Ayıraçlar.....	28
4.2.6.1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayıraçlar.....	28
4.2.6.2. PCR Analizinde Kullanılan Ayıraçlar.....	29
4.2.6.3. Elektroforez İşleminde Kullanılan Ayıraçlar.....	30
4.2.7. Frotilerin Mikroskopik Muayenesi.....	31

4.2.8. Kenelerin Teşhisi.....	31
4.3. İstatistiksel Analiz.....	31
5. BULGULAR.....	32
5.1. <i>Theileria ovis</i> Primerlerinin Spesifite ve Sensitivitesi.....	32
5.2. Mikroskopik Muayene.....	35
5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	37
5.4. Kene Türleri.....	41
6. TARTIŞMA.....	43
7. KAYNAKLAR.....	54
8. ÖZGEÇMİŞ.....	62
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
	<u>No</u>
Tablo 1. Çalışmanın yürütüldüğü odaklar ile bu odaklarda koyun ve keçilerden toplanan örnek sayıları ve odaklara göre dağılımı	21
Tablo 2. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan <i>Theileria ovis</i> ve <i>Theileria lestoquardi</i> primerleri.....	23
Tablo 3. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde koyun ve keçilerden hazırlanan kan frotilerinin mikroskopik bakı sonuçları.....	35
Tablo 4. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde <i>Theileria ovis</i> yönünden incelenen koyun ve keçilerin PCR ve nested PCR sonuçları.....	38
Tablo 5. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde koyun ve keçilerden alınan örneklerin mikroskopik bakı, PCR ve nested PCR sonuçlarının odaklara göre karşılaştırılması.....	40
Tablo 6. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde koyun ve keçilerden alınan örneklerin mikroskopik bakı, PCR ve nested PCR sonuçlarının karşılaştırılması.....	40
Tablo 7. Muş ve Malatya yörelerinde koyun ve keçilerden toplanan kene türleri ve oranları.....	42

ŞEKİL LİSTESİ

		<u>Sayfa</u>
		<u>No</u>
Şekil 1.	Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde koyun ve keçilerden EDTA'lı kan, kan ve lenf frotisi ile kene örneklerinin toplandığı iller.....	19
Şekil 2.	<i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> türlerini amplifiye eden genel primerler (989/990, 5-22F/1661R) ile yapılan PCR sonuçları.....	32
Şekil 3 - A, B.	<i>T. ovis</i> spesifik primerlerle yapılan PCR sonuçları.....	33
Şekil 4 - A, B.	<i>Theileria ovis</i> ile enfekte koyun kanının seri dilüsyonlarından ekstrakte edilen DNA'larla yapılan PCR sonuçları.....	34

1. ÖZET

Bu araştırma, Haziran 2004 - Eylül 2005 tarihleri arasında Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde koyun ve keçilerde *Theileria ovis* ve *T. lestoquardi*'nin varlığı ve yayılışının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, ilk aşamada *T. ovis*'in teşhisine yönelik spesifik PCR metodu geliştirilmiş ve daha sonra koyun ve keçilerde *T. ovis*'in yayılışı ile aynı bölgede *T. lestoquardi*'nin varlığı araştırılmıştır.

Theileria ovis Erzincan koyun izolatına ait 18S SSU rRNA gen dizisi (Genbank No: AY508453) esas alınarak iki çift primer dizayn edilmiştir. Primerler önce bilgisayar ortamında BLAST programı uygulanarak gen bankasında mevcut sekanslara karşı, daha sonra laboratuvarında PCR ile *T. ovis*, *T. lestoquardi*, *T. annulata*, *T. parva*, *T. buffeli* ve *Babesia ovis*'e karşı test edilmiştir. Ayrıca parazitemi oranı bilinen enfekte kanın % 10⁻², % 10⁻³, % 10⁻⁴, % 10⁻⁵, % 10⁻⁶, % 10⁻⁷ ve % 10⁻⁸ basamaklarındaki dilüsyonları kullanılarak bu metodun, *T. ovis*'i belirleme limiti (sensitivite) tespit edilmiştir.

Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde bazı illere ait farklı odaklardaki koyun ve keçilerden 819 EDTA'lı kan örneği toplanmış (677 koyun, 142 keçi) ve bu kanlardan 795 kan frotisi (656 koyun, 139 keçi) hazırlanmıştır. Bunlara ilaveten Mardin ilinde theileriosisiden şüpheli 27 koyundan, ayrıca lenf frotisi hazırlanmıştır. EDTA'lı kanlardan ekstrakte edilen DNA'lar, *T. ovis* ve *T. lestoquardi* yönünden PCR ile, kan ve lenf frotileri *Theileria*'nın piroplasm ve şizont formları yönünden mikroskopik bakı ile incelenmiştir.

Ayrıca Muş ve Malatya illerinde koyunlardan 531, keçilerden 89 olmak üzere toplam 620 adet erişkin kene toplanmıştır. Toplanan keneler stereo mikroskop altında incelenerek tür teşhisleri yapılmıştır.

Theileria ovis ile doğal enfekte koyun ve keçilerden elde edilen kanlarda parazitin 398 baz çifti uzunluğundaki bir bölümü nested PCR ile spesifik olarak amplifiye edilmiştir. Buna karşılık, bu primerlerin diğer *Theileria* türleri ile *B. ovis*'i amplifiye etmediği görülmüştür. Nested PCR'in paraziti belirleme limiti 10^{-5} olarak belirlenmiştir. Bu değer, metodun *T. ovis*'i on milyonda bir enfekte eritrositte belirleyebilecek duyarlılıkta olduğunu göstermiştir.

Kan frotilerinin mikroskopik muayenesinde, 656 koyunun 120 (% 18,29)'sinde, 139 keçinin 4 (% 2,87)'ünde *Theileria* spp. piroplasm formları tespit edilmiştir. Lenf frotilerinin hiç birinde parazitin şizont formlarına rastlanmamıştır. İlk aşama PCR sonucunda, incelenen 677 koyunun 308 (% 45,49)'inde, 142 keçinin 9 (% 6,34)'unda *T. ovis* amplifiye edilmiştir. Nested PCR sonucunda ise, koyunların 398 (% 58,78)'inde, keçilerin 16 (% 11,26)'sında *T. ovis* amplifiye edilmiştir. Aynı hayvanların hiç birinde PCR ile *T. lestoquardi*'nin varlığını gösterecek amplifikasyon ürünü elde edilememiştir.

Koyun ve keçilerin üzerinden toplanan keneler *Rhipicephalus bursa* ve *R. sanguineus* olarak identifiye edilmiştir.

Gerek mikroskopik muayene ile PCR sonuçları arasındaki fark ve gerekse ilk aşama PCR ile nested PCR sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,01$). *T. ovis* enfeksiyonları keçilere göre koyunlarda daha yüksek bulunmuş ve aradaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya konmuştur ($P<0,01$).

Anahtar Kelimeler: Theileriosis, mikroskopik bakı, PCR, koyun, keçi.

2. ABSTRACT

This study was carried out to determine the presence and distribution of *Theileria ovis* and *T. lestoquardi* in sheep and goats in East and Southeast Anatolian regions between June 2004 and September 2005. Firstly, a nested polymerase chain reaction (PCR) method was developed for the specific diagnosis of *T. ovis*, and then the prevalence of *T. ovis* in sheep and goats was investigated by the method. In addition, the presence of *T. lestoquardi* in the same region was also investigated.

Two oligonucleotide primers were designed from the 18S SSU rRNA gene sequence (Genbank No: AY508453) of *T. ovis* isolated from sheep in Erzincan. The primer sequences were tested with BLAST program in computer. Then, DNAs from *T. ovis*, *T. lestoquardi*, *T. annulata*, *T. parva*, *T. buffeli* and *Babesia ovis* were tested in the PCR in laboratory. In addition, detection limit of the PCR for *T. ovis* was determined using dilution of *T. ovis*-infected erythrocytes with % 10^{-2} , % 10^{-3} , % 10^{-4} , % 10^{-5} , % 10^{-6} , % 10^{-7} and % 10^{-8} parasitemia.

A total of 819 whole blood (677 sheep and 142 goats) and 795 blood smear (656 sheep and 139 goats) were collected from sheep and goats at different locations in the region. At the same time, 27 lymph smear samples were collected in sheep in Mardin. In addition, a total of 531 tick in sheep and 89 ticks in goats were collected in Mus and Malatya provinces. Ticks were examined under stereomicroscope for species identification. *T. ovis* and *T. lestoquardi* DNAs extracted from sheep and goats blood were amplified by PCR using species-specific

primers. Blood and lymph smears were examined for *Theileria* piroplasms and schizonts forms by microscopic examination (ME).

A 398-bp DNA fragment was specifically amplified from blood samples from sheep naturally infected with *T. ovis*. No PCR products resulted from *T. lestoquardi*, *T. annulata*, *T. parva*, *T. buffeli* and *B. ovis* DNA using these specific primers. The sensitivity of the nested PCR for *T. ovis* which was assessed showed that one infected cell in 10^7 sheep erythrocytes, equivalent to a blood parasitemia of 10^{-5} %, could be detected.

In the microscopic examination of blood smears, *Theileria spp.* piroplasms were observed in 120 out of 656 sheep (18.29 %) and 4 out of 139 goats (2.87 %), respectively. Schizont forms of the parasite were not seen in lymph node smears. Of the 819 field samples obtained from 677 sheep and 142 goats tested, 308 (45.49 %) and 9 (6.34 %) were positive for the presence of *T. ovis* by the first round PCR, respectively compared to 398 (58.78 %) and 16 (11.26 %) positive for *T. ovis* by nested PCR. *T. lestoquardi* was not amplified in the same animals by PCR.

Ticks collected from sheep and goats were identified to be *Rhipicephalus bursa* and *R. sanguineus* on the basis of morphological features.

The differences between ME and PCR results and between the first round and nested PCR results were statistically significant ($P < 0.01$). The frequency of *T. ovis* infection was higher in sheep than in goats and difference between the infection rates of sheep and goats were found to be statistically significant ($P < 0.01$).

Keywords: Theileriosis, microscopic examination, PCR, sheep, goat.

1. GİRİŞ

Koyun ve keçi theileriosisi, başta Akdeniz Havzası ve Orta Doğu olmak üzere, Avrupa, Afrika ve Asya'nın büyük bir kesiminde klinik veya subklinik enfeksiyonlar şeklinde görülür. Hastalık, *Theileria* soyuna bağlı *Theileria lestoquardi*, *Theileria* sp. China, *T. ovis* ve *T. separata* türleri tarafından oluşturulur. Bu etkenler, *Ixodidae* ailesine bağlı keneler tarafından transtadial olarak (safhadan safhaya) nakledilir (36, 68, 77, 102).

Theileria etkenleri ilk defa Robert Koch tarafından, Doğu Afrika'da sığırların kanında eritrositler içerisinde tespit edilmiş ve bu etkenler küçük piroplasma olarak ifade edilmiştir. Dschunkowsky ve Luhs 1903 yılında Kafkasya sığırlarında keşfettikleri hastalığa tropikal piroplasmose, kanda görülen etkenlerin yuvarlak olmasından dolayı da bu etkenlere *Piroplasma annulatum* adını vermiştir. Sonraki yıllarda eritrositler içindeki etkenlere *T. annulata* adı verilmiştir. Portekizli araştırmacılar Borges, Bettécourta ve Francia 1907 yılında bu paraziti, *Piroplasma bigenum* ile mukayese etmişler ve iç organlarda *Piroplasma annulatum*'un şizontlarını görerek, bu küçük organizmaları *Theileria* adını verdikleri yeni bir soy içine almışlardır. *Theileria* ve diğerleri arasındaki fark 1918'de Du Toit tarafından açıklanmış ve ortaya *Theileridae* adında yeni bir aile çıkmıştır (32). Birçok araştırmacı tarafından, elektron mikroskopta ince yapılarına göre sistematigi yapılan *Theileria* parazitleri, Soulsby tarafından aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır (97).

Altalem: Protozoa

Bölüm: Apicomplexa

Sınıf: Sporozoa

Alt Sınıf: Piroplasmia

Takım: Piroplasmida

Aile: Theileridae

Soy: Theileria

Theileria türlerinin biyolojisi farklılıklar göstermekle birlikte, temelde benzerdir. Parazitlerin hayat siklusu, *Ixodidae* ailesinde yer alan keneler ile çeşitli memeli hayvanlar arasında geçer. Larva ve nimf safhasında enfekte hayvandan kan emen keneler, kanla birlikte eritrositler içindeki etkenleri de alırlar. Bu etkenler kene bağırsağında gametogoni yoluyla gelişirler. Kenenin bir sonraki gelişme aşamasında tükürük bezlerine gelen etkenler, burada sporogoni dönemini geçirir ve sporozoitleri meydana getirirler. Enfekte keneler tarafından konağa verilen sporozoitler, bölgesel lenf yumrularına taşınırlar ve lenfositlere girerek, şizontları oluştururlar. Bu esnada konak hücreyi de bölünmeye teşvik ederler. Önce makroşizontlar, bunlardan mikroşizontlar ve bunu takiben merozoitler şekillenir. Merozoitler de eritrositlere girerek piroplasm formlarını oluştururlar (72).

Koyun ve keçilerde *Theileria* soyuna bağlı *T. lestoquardi*, *Theileria* sp. China, *T. ovis* ve *T. separata* türlerinin varlığı ortaya konmuştur (36, 68, 77, 93, 102). Bu türlerin eritrositler içindeki piroplasm formları yuvarlak, oval, batone, anaplasmod, armut ya da çomak şeklindedirler. Bu formların büyüklüğü 0.5-2 µm'dir (66).

Theileria lestoquardi'nin eritrositik formları genellikle yuvarlak, oval, batone ya da anaplasmod şekillerde olup, yuvarlak ve oval formlar çoğunluktadır. Yuvarlak formlar 0.6-2 µm çapında, oval formlar ise 1.6 µm uzunluğundadır. Küçük armut formlar 0.5-1.5 µm, anaplasmod şekiller 0.5-1.2 µm çapındadır. Giemza ile boyanmış preparatlarda parazitin sitoplazması açık mavi, çekirdeği kırmızı mor renkte görülür. Çekirdek, halka formların bir kenarında, diğer formların ise geniş kısmında bulunur. Halka ve oval şekillerin ortasında bir vakuol yer alır. Anaplasmod şekillerde sitoplazma güçlükle ayırt edilir. *T. lestoquardi*'nin şizontlarına lenf yumruları ve dalak ile serbest lenfoblastoid seri hücrelerinde rastlanır. Şizontların büyüklüğü ortalama 8 µm'dir. Bunlar, kırmızımsı mavi rekte, 1-2 µm çapında, 1-80 adet granül ihtiva ederler. Bunlardan 1-2 µm çapındaki merozoitler oluşur (66).

Theileria ovis'in piroplasm ve şizont formları, *T. lestoquardi*'ninkilere benzer. Ancak *T. ovis* enfeksiyonlarında, kanda parazitemi oranı çok düşüktür. Öte yandan lenf yumrusu, dalak ve karaciğer ile serbest lenfoblastoid hücrelerde bu türün şizontlarına rastlamak çok zordur. Yine *T. lestoquardi*'nin eritrositler içindeki çomak formları, *T. ovis*'de görülmez. *T. ovis* ile enfekte eritrositlerde ise sitoplazma içinde silik bir veil (peçe) bulunur (66, 102).

Theileria separata'nın piroplasm formları yuvarlak, oval, bazen çomak şeklindedir. Bu tür ile enfekte eritrositin bir kenarındaki çöküntüde iyi teşekkül etmiş bir veil bulunur. Ayrıca enfekte eritrositin içinde nokta şeklinde bir leke de bulunur (103).

Theileria türleri, enfekte hayvandan alınan kan, lenfoid doku emülsiyonu ve enfekte doku kültürü hücrelerinin inokülasyonu ile mekanik, *Ixodidae* ailesine

bağlı kene türleri ile de biyolojik olarak nakledilirler (17, 29, 59, 67, 71, 72, 97). Ancak koyun ve keçilerde theileriosis'e neden olan türlerin naklinde rol oynayan keneler tam olarak bilinmemektedir.

Theileria lestoquardi'nin, *Hyalomma anatolicum anatolicum* ve *Rhipicephalus* spp. ile deneysel olarak nakledildiği bildirilmiştir (53, 95). Koyunlardan toplanan *H. a. anatolicum* ve *R. sanguineus*'un tükürük bezlerinde sırası ile % 15 ve % 4 oranlarında Fulgen pozitif cisimcikler tespit edilmiştir (84).

Birçok kene türünün *T. lestoquardi*'yi bir hayvandan diğerine nakledebileceği bildirilse de, genel kabul bu parazitin sahada *H. a. anatolicum* ile nakledildiği yönündedir (36, 102). Ancak, bu kenenin bulunmadığı bazı bölgelerde, koyun ve keçilerde *T. lestoquardi* enfeksiyonlarının görülmesi, hastalığın diğer kene türleri ile de nakledilebileceğini düşündürmektedir (36). Nitekim *H. a. anatolicum*'un bulunmadığı Sudan'ın Blue Nil bölgesinde, koyunlarda IFAT ile % 14 oranında seropozitiflik belirlenmiş ve *T. lestoquardi*'nin bölgede görülen *R. sanguineus*, *R. evertsi*, *H. impeltatum*, *Haemaphysalis rufipes* gibi kene türleri ile nakledilebileceği belirtilmiştir (86).

Theileria ovis'in vektörü olarak değişik bölgelerde farklı kene türleri rapor edilmiştir. Parazitin Güney Afrika'da *R. evertsi* (56), *R. bursa* (76), *R. haemaphysaloides* (40), *H. a. anatolicum* (102), İngiltere'de *Hae. punctata* (8), eski Sovyetler Birliğinde *R. bursa*, *Dermacentor sylvarum*, *Hae. sulcata* ve *Ornithodoros laharensis* ile nakledildiği ifade edilmiştir (67, 97). Bunlardan *R. evertsi* (56, 73), *Hae. punctata* (8), *R. haemaphysaloides* (40), *H. a. anatolicum* (102) ve *R. bursa*'nın (76) *T. ovis*'i transtatidal olarak taşıdığı deneylerle gösterilmiştir. Türkiye'de *T. ovis* ile enfekte bir koyun üzerinde beslenen aç olgun

H. a. anatolicum'un tükürük bezi asini hücrelerinde Methyle Green Pyronin boyama metodu ile *Theileria* sporoblastları (91), sahadaki koyunlar üzerinden toplanan *R. bursa*'nın tükürük bezi asini hücrelerinde ise PCR ile *T. ovis*'in sporozoitleri tespit edilmiştir (3). İspanya'da *T. ovis*'in vektörünün *R. bursa* olduğu, ancak bu kenenin bulunmadığı bazı bölgelerde IFAT ile koyunlarda seropozitiflik belirlendiği, seropozitif koyunlarda *R. turanicus*'un yaygın olarak bulunduğu ve dolayısı ile bu kenenin parazit için vektör olabileceği belirtilmiştir (35).

Afrika'da koyunlarda görülen bir tür olan *T. separata*'nın *R. evertsi* ile nakledildiği ifade edilmiştir (103).

Türkiye'de evcil ve yabani hayvanlarda mera keneleri yaygın olarak bulunmakta olup, bugüne kadar *Ixodidae* ve *Argasidae* ailelerine bağlı 30'un üzerinde tür tespit edilmiştir (13, 49, 63, 74, 80, 90).

Malatya ve bazı Güney Doğu Anadolu illerinde yapılan bir çalışmada, koyun ve keçilerde *Ixodidae* ailesine bağlı 10 farklı türün bulunduğu ve en yaygın türlerin *H. a. excavatum*, *Hae. parva*, *R. bursa* ve *R. sanguineus* olduğu (49), Elazığ yöresinde kene enfestasyonunun koyunlarda % 15-46, keçilerde % 10-45 arasında değiştiği, koyunlarda *Ixodidae* ve *Argasidae* ailelerine bağlı 11, keçilerde ise 8 türün bulunduğu ve en fazla *R. bursa* ve *R. sanguineus* türlerine rastlandığı bildirilmiştir. (90). Güney Marmara bölgesinde koyunlarda 13, keçilerde 12 türe rastlandığı (13), Burdur yöresinde koyunlarda 5 türün erişkini ile 3 türe ait nimflere, keçilerde 4 türün erişkini ile bir türe ait nimflere rastlandığı (111), Kayseri yöresinde ise koyun ve keçilerde 8 ayrı türün bulunduğu (55) bildirilmiştir.

Koyun ve keçi theileriosisi, başta hastalığa neden olan türün patojenitesi olmak üzere, birçok faktöre bağlı olarak klinik ya da subklinik seyirli olabilir. Patojen türlerin oluşturduğu akut enfeksiyonlar çoğunlukla ölümlü sonuçlanırken, apatojen türlerden kaynaklanan enfeksiyonlarda klinik bulgular görülmez (36, 67, 68, 77, 102).

Theileria lestoquardi koyun ve keçilerde yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden klinik enfeksiyonlar oluşturur (14, 52, 104). Bu türün oluşturduğu hastalık, parazit suşunun virulansına ve konağın duyarlılığına göre değişmekle birlikte, genellikle akut seyreder. Hastalığın, genç hayvanlarda muhtemelen maternal antikorlara bağlı olarak daha hafif seyrettiği (97), ancak endemik stabil bölgelerde, hastalığın prevalansında hayvanın yaş ve cinsiyetinin önemli olmadığı belirtilmiştir (84). Bazı araştırmacılar ise hastalığın, genç hayvanlarda daha yüksek morbidite ve mortaliteyle seyrettiğini bildirmişlerdir (48, 68). Enfeksiyon, genellikle ilkbahar sonu olmak üzere vektör kenenin aktif olduğu dönemde görülür (50).

Akut formda ilk olarak beden ısısı yükselir ve 4-5 gün sürer. Hastalarda kayıtsızlık, keyifsizlik, burun akıntısı, mukozalarda solgunluk, ilerlemiş olaylarda sarılık, nabız hızında artma, solunum güçlüğü, süt veriminde azalma ve çene altında ödem görülür. Yüzeysel lenf yumruları büyür. İdrar koyu sarı bir renktedir. Sıklıkla geçici bir hemoglobinüri görülür. Hayvanlar çok zayıflar ve dengesiz hareket ederler. Eğer bitkinlikten ölmezlerse klinik bulgular birkaç hafta sonra yavaş yavaş hafifler ve sonunda iyileşirler (36, 43, 67, 102).

Subakut formda semptomlar akut forma göre daha hafiftir (43).

Kronik form ise genellikle akut ya da subakut formun devamında görülür (43).

Bazı vakalarda hastalık, başlangıçtan itibaren kronik seyir gösterebilir ve iyileşme ile sonuçlanır (43, 97).

Koyun ve keçilerde bulunan diğer bir türde *T. ovis*'tir. *T. ovis*, apatojen ya da düşük patojeniteli bir tür olarak kabul edilmektedir. Kene ile nakilde 9-13 günlük bir inkübasyon süresine sahiptir. Enfeksiyon 5-16 gün sürer. Hastalıkta, kendiliğinden kaybolan hafif bir ateş, kenenin ısırıldığı bölgedeki lenf yumrusunda bir büyüme ve hafif bir aneminin görülebileceğini ifade edenler olduğu gibi (67), normal şartlarda enfeksiyonun her hangi bir klinik değişikliğe yol açmadığını ifade edenler de vardır (50, 102). Bazı araştırmacılar, dalağı çıkarılmış koyunlarda klinik tablonun şekillendiğini bildirmişlerdir (76).

Koyunlarda *T. ovis*'in, *Theileria* sp. OT1 ve *Theileria* sp. OT3 olmak üzere iki genotipinin bulunduğu, bunlardan *Theileria* sp. OT3'ün, abortların görüldüğü sürülerde normal sürülere göre daha yüksek bir prevalansa sahip olduğu, ancak *Theileria* sp. OT3 ile abortlar arasındaki ilişkinin açıklığa kavuşturulabilmesi için ileri çalışmaların yapılmasının gerektiği ifade edilmiştir (75).

Theileria separata, sadece koyunlarda enfeksiyona neden olmakta ve apatojen bir tür olarak kabul edilmektedir (102).

Koyun ve keçilerde theileriosis Ortadoğu, Akdeniz havzası, Avrupa, Asya, Afrika, Hindistan ve Çin'i içine alan geniş bir alanda görülür (36, 68, 77, 102).

Theileria lestoquardi, Güney Doğu Avrupa, Kuzey Afrika, Orta ve Yakın Doğu ile Doğu ve Güney Doğu Asya ülkelerinde koyun ve keçilerde enfeksiyonlara neden olmaktadır (36, 77, 99, 102, 105).

Irak'ta kan frotilerinin mikroskopik bakısına dayanan çalışmada, koyunlarda *T. lestoquardi* prevalansının % 33,6 olduğu belirlenmiştir (7). İran'da theileriosisden şüpheli 188 koyunun % 36,17'sinin, *T. lestoquardi* piroplasm formlarını taşıdığı bildirilmiştir (84). Çin'de yapılan bir çalışmada, mikroskopik bakı sonuçlarına göre *Theileria* sp. China prevalansı, kuzularda, % 91,7, oğlaklarda % 64,29, koyunlarda % 63,13, keçilerde % 20 olarak belirlenmiştir (48). Sudan'ın 9 farklı bölgesinde indirek floresan antikor testi (IFAT) ile yapılan serolojik bir çalışmada, koyunlarda *T. lestoquardi*'nin seroprevalansının % 16,2 olduğu ortaya konmuştur (86).

Theileria ovis, *T. lestoquardi*'den daha geniş bir coğrafyada görülür. Bu türün, bütün Afrika; Güney, Orta ve Doğu Avrupa; Orta, Doğu ve Güney Asya ülkelerinde koyun ve keçilerde görüldüğü bildirilmiştir (23, 75, 82, 96, 102).

Mısır'da, kan frotilerinin mikroskopik bakısına dayanan bir çalışmada, 475 koyunun % 2,9'unda, 200 keçinin % 7,5'inde *T. ovis*'in piroplasm formları belirlenmiştir (70). Çeşitli ülkelerde IFAT ile *T. ovis*'in varlığı araştırılmıştır. Bu yöntemle Makedonya'da, 721 koyunun % 24,6'sında, 487 keçi'nin % 0,6'sında (82), İspanya'da muayene edilen koyunların % 18,9, keçilerin % 0,89'unda *T. ovis*'e karşı şekillenen antikorlar belirlenmiş (35), Suriye'de sağlıklı görünüşlü 913 koyunun % 59,9'unda *Theileria* spp. antikorlarının varlığı ortaya konmuştur (12). İspanya'da reverse line blotting (RLB) metodu ile yapılan bir çalışmada, 320 koyunun % 21,2'sinde *T. ovis* tespit edilmiştir (75).

Türkiye’de sığır theileriosisi ile ilgili mikroskopik, serolojik ve moleküler yöntemlerle yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur (5, 6, 26, 30, 31, 34, 41, 54, 88, 107). Buna karşılık koyun ve keçi theileriosisi ile ilgili yayınlar sınırlı olup, bu çalışmaların çoğu perifer kan frotilerinin mikroskopik muayenesi ile yapılmıştır (16, 42, 51, 65). Karacabey Harasında 1931 yılında yapılan çalışmada koyunlarda *T. ovis* enfeksiyonları belirlenmiş (65), Ankara yöresinde değişik zamanlarda hastalanıp ölen 14 koyun ve 1 keçinin parazitolojik muayenesinde tespit edilen piroplasm formların *T. hirci* (*T. lestoquardi*) olduğu ifade edilmiş (16), Türkiye genelini kapsayan başka bir çalışmada, koyun ve keçilerde *T. ovis* enfeksiyonlarının belirlendiği, keçilerdeki parazitin *T. hirci* (*T. lestoquardi*) olabileceği belirtilmiştir (51). Orta Anadolu’da yapılan bir çalışmada, klinik babesiosisli 579 koyunun % 18,26’sının, sağlıklı görünüşlü 236 koyunun % 59’unun ve 77 keçinin % 31’inin *T. recondita* (*T. ovis*) ile enfekte olduğu bildirilmiştir (42). Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu İllerinde yapılan araştırmada, koyun ve keçilerin % 1-4’ünün kan frotisinde *Theileria*’nın piroplasm formları belirlenmiştir (81). Aynı yöntemle Kayseri yöresinde koyunların % 18,44’ünün, keçilerin ise % 6’sının, etkenin piroplasm formlarını taşıdığı bildirilmiştir (55). Orta, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde mikroskopik ve serolojik yöntemlerle yapılan bir çalışmada, 687 koyunun % 37,55’inde *Theileria* piroplasmaları, % 60,26’sında anti-*T. ovis* antikorları; 85 keçinin % 5,62’sinde piroplasm şekilleri, % 8,99’unda de anti-*T. ovis* antikorları saptanmış, bu bölgelerde koyun ve keçilerde *T. lestoquardi* enfeksiyonunun bulunmadığı rapor edilmiştir (91).

Theileriosisin teşhisi, akut vakalarda klinik bulgular ve Giemsa ile boyanmış kan ve lenf yumrusu biyopsi materyalinden hazırlanan frotilerinin mikroskopik muayenesiyle yapılırken, latent enfeksiyonların saptanmasında uzun süre serolojik yöntemler kullanılmıştır (6, 9, 12, 19, 35, 44, 46, 82, 86, 110). *Theileria* piroplazmalarının morfolojik yapıları benzer olduğundan, mikroskopik muayene ile tür ayırımının zor olduğu (97, 102), bu türler arasında çapraz-reaksiyonların görülebilmesi, spesifik immun yanıtların zayıf olabilmesi ve uzun süreli portörlük durumunda antikorların her zaman tespit edilememesi gibi sebeplerden dolayı, serolojik yöntemlerde yanlış pozitif ve negatif sonuçların söz konusu olabileceği ileri sürülmüştür (20, 46, 64, 83, 91). Moleküler biyolojik yöntemlerdeki gelişmelere paralel olarak, başta polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) olmak üzere, konvansiyonel tekniklere göre daha yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip çeşitli metotlar, pek çok paraziter hastalığın tanısı, tanımlanması ve tür ayırımlarının yapılmasında kullanılmıştır (5, 45, 60, 75, 85, 98, 100, 101, 107).

Theileriosis ile ilgili gerek epidemiyolojik çalışmalarda ve gerekse türlerin identifikasyonunda, mikroskopik muayene yöntemi yanılgılara sebep olabilmektedir (102). Ayrıca, *Theileria* enfeksiyonlarını atlatan ve portör durumuna geçen hayvanların, Giemsa ile boyanmış kan frotilerinde, etkenlerin eritrositler içindeki piroplasmik formlarının tespiti oldukça zordur. Bununla birlikte, koyun ve keçi theileriosisi ile ilgili, kan frotilerinin mikroskopik bakışı ile gerek ülkemizde ve gerekse başka ülkelerde çok sayıda çalışma mevcuttur (7, 42, 48, 55, 70, 81, 84).

Özellikle latent enfeksiyonların saptanmasında serolojik testlerden yararlanılmaktadır (1, 9, 37, 64, 86). Sığırlarda, theileriosis ile ilgili epidemiyolojik çalışmalarda tüp aglütinasyon testi, indirek hemaglutinasyon testi (IH), komplement fiksasyon testi (CFT), indirek floresans antikor testi (IFAT) ve enzim-linked immunosorbent assay (ELISA) kullanılmaktadır (27, 44, 110). Özellikle IFAT ve CFT tek tırnaklılarda babesiosisin tanısında standart testler olarak önerilmektedir (75). Bu testlerden IFAT ve ELISA koyun ve keçi theileriosisi ile ilgili epidemiyolojik çalışmalarda da kullanılmıştır (12, 35, 37, 82, 86). Şizontla enfekte lenfoblastoid hücreler kullanılarak, IFAT ile *T. lestoquardi* antikorları belirlenmiş, *T. lestoquardi*'nin, *T. separata* ile düşük, *T. annulata* ile yüksek seviyede çapraz reaksiyon verdiği bildirilmiştir (64). Yine IFAT ile *T. ovis*'in piroplasm antijenleri kullanılarak, koyun ve keçilerde *T. ovis*'e karşı şekillenen antikorlar ortaya konmuş, *T. ovis* ile *T. lestoquardi* ve *T. annulata* arasında çapraz reaksiyonların oluştuğu bildirilmiştir (91).

Parazitoloji alanında moleküler biyolojik metotların kullanımı, 15 yılı aşkın bir süredir artarak devam etmektedir. Moleküler teknikler, birçok durumda sadece spesifite ve sensitiviteyi artırmakla kalmaz, aynı zamanda doğada var olan morfolojik ve biyolojik bilgilerin izahında yanlıgıları azaltır. DNA'nın farklı bölgelerden kesilmesi esasına dayanan restriction fragment length polymorphisms (RFLP), parazitoloji alanında kullanılan ilk moleküler tekniktir. Daha sonraları, sensitiviteyi artırmak için southern blot gibi hibridizasyon teknikleri kullanılmıştır (114). Ancak son yıllarda hibridizasyon tekniklerinin yerine, daha yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olan PCR ve PCR temelli metotlardan PCR-RFLP, multiplex PCR (112, 113), random amplified polymorphic DNA (RAPD), single-

sequence conformational polymorphysim (SSCB) (38, 39), real-time fluorescence-based PCR (RT-PCR) (25, 57), RLB (45) gibi yöntemler kullanılmaya başlanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu konvansiyonel tekniklere göre, *Theileria* ve *Babesia* gibi kan parazitlerinin tanısında yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu için, özellikle epidemiyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (5, 11, 28, 30, 61, 62, 79, 87). Koyunlarda *Theileria* enfeksiyonlarının teşhisinde, moleküler metot ilk olarak, Kırvar ve ark. (61) tarafından kullanılmıştır. Bu araştırmacılar, koyun ve keçilerde *T. lestoquardi*'nin teşhisine yönelik spesifik bir PCR metodu geliştirmişlerdir. Ancak, bu güne kadar koyun ve keçilerde *T. ovis*'in teşhisine yönelik spesifik bir PCR metodu uygulanmamıştır.

Türkiye'de koyun theileriosisi ile ilgili ilk moleküler çalışma Aktaş ve ark. (4) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar, Erzincan'da koyunlardan elde ettikleri *Theileria* izolatlarının Small Subunit rRNA (SSU rRNA) gen analizi sonucunda, bu izolatların gen dizilimlerinin koyun ve keçiler için patojen türler olan *T. lestoquardi* ve *Theileri* sp. China'dan çok farklı olduğunu ve bu parazitlerin *T. ovis* olduklarını tespit etmişlerdir. Bu gün Türkiye'de koyun ve keçilerde *T. ovis*'in varlığı bilinmektedir. Ancak bu türün yayılışı ile ilgili moleküler metotların kullanıldığı bir çalışma bulunmadığı gibi, diğer türlerin varlığının araştırılmasına yönelik her hangi bir moleküler çalışma da yapılmamıştır. Oysa subtropikal iklim kuşağında yer alan ülkemizde, başta theileriosis ve babesiosis olmak üzere kene ile nakledilen hastalıklar yaygın olarak görülmektedir (89). Bu hastalıklara karşı uygun kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde, hastalığın etiolojisinin, etkeni nakleden vektör kenelerin, keneler için enfeksiyon kaynağı

olan taşıyıcı hayvanların ve bunların sürü popülasyonu içindeki prevalanslarının belirlenmesi, elde edilmesi gereken önemli veriler olarak kabul edilmektedir. Bunun için Türkiye’de koyun ve keçi theileriosisi ile ilgili epidemiyolojik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, *T. ovis* ile diğer *Theileria* türlerinin identifikasyonunu sağlayacak spesifik bir PCR metodunun geliştirilmesi ve bu metodun sahada uygulanabilirliğinin ortaya konması, bu metotla Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde bazı illerde (Erzincan, Erzurum, Muş, Malatya, Iğdır, Mardin ve Diyarbakır) *T. ovis*’in koyun ve keçilerdeki yaygınlığının belirlenmesi ve çeşitli ülkelerde koyun ve keçilerde şiddetli hastalık oluşturarak ölümlere neden olan, İran ve Irak gibi Türkiye’ye komşu ülkelerde de yaygın olarak görülen *T. lestoquardi*’nin varlığının araştırılması hedeflenmiştir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde koyun ve keçilerde *T. ovis* ve *T. lestoquardi*'nin varlığı ve yayılışının belirlenmesi amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla, ilk aşamada *T. ovis*'in teşhisine yönelik spesifik PCR metodunun geliştirilmesi, daha sonra bu yöntemle koyun ve keçilerde *T. ovis*'in yayılışının araştırılması, ayrıca koyun ve keçiler için patojen bir tür olan *T. lestoquardi*'nin varlığının ortaya konması hedeflenmiştir. Bu çalışma süresince bazı odaklarda örnek toplanan koyun ve keçiler üzerindeki kenelerin tür tayinleri de yapılmıştır.

4.1. Saha Çalışmaları

Bu çalışma, Haziran 2004 - Eylül 2005 tarihleri arasında Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yer alan bazı illere bağlı çeşitli odaklarda yürütülmüştür. Bu iller ile odaklar Erzincan (Merkez, Saztepe, Han Çiftliği, Üzümlü, Çatitepe ve Günebakan), Erzurum (Merkez, Aşkale, Horasan, Çat, Karayazı ve Ilıca), Muş (Merkez ve Yücepe), Malatya (Merkez, Dilek, Yeşilyurt ve Battalgazi), Iğdır (Merkez, Tuzluca ve Aralık), Mardin (Merkez, Yeşilli, Ömerli ve Kızıltepe) ve Diyarbakır (Merkez, Ergani, Çınar, Çermik, Dicle)'dir (Şekil 1).



Şekil 1. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde koyun ve keçilerden EDTA'lı kan, kan ve lenf frotisi ile kene örneklerinin toplandığı iller.

4.1.1. Numunelerin Toplanması

Haziran 2004 - Eylül 2005 tarihleri arasında adı geçen illere gidilerek, her ilde değişik odaklar belirlenmiş ve bu odaklardaki sürülerden rastgele seçilen koyun ve keçilerden DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere EDTA'lı tüplere 3'er ml kan alınmıştır. Örneklemede, sürünün büyüklüğüne göre her sürüden 5-25 hayvan rastgele seçilmiş ve bunların en az bir hastalık sezonu (Nisan-Eylül ayları arası) geçirmiş olmalarına dikkat edilmiştir. Her kan örneğine ait sürme frotiler, örneklerin alınmasından hemen sonra EDTA'lı tüplerden alınan bir damla kandan hazırlanmış ve özel froti saklama kutularına yerleştirilmiştir. Frotilerin hazırlanmasından sonra EDTA'lı kanlar, +4°C'yi sağlayan termosta muhafaza edilmiştir. Ayrıca, Mardin ilinde klinik olarak theileriosis şüpheli koyunlardan kan ve kan frotilerine ilave olarak lenf yumrusu biyopsi materyali alınarak frotiler hazırlanmıştır.

Kan örneği alınan hayvanların kuyruk altı, perineum, scrotum, meme, prepisyum, kulak içi, boyun altı ve sternum bölgeleri kene enfestasyonu yönünden muayene edilmiş ve toplanan keneler, kene toplama şişelerine alınmıştır. Şişelerin ağzı ıslak pamukla kapatılarak, termos içine konmuş ve diğer numuneler ile birlikte laboratuvara getirilmiştir.

Saha çalışmaları sonucunda, Doğu Anadolu'dan 444 (Erzincan'dan 119, Erzurum'dan 125, Muş'tan 67, Iğdır'dan 87, Malatya'dan 46) ve Güneydoğu Anadolu'dan 233 (Mardin'den 112, Diyarbakır'dan 121) koyun ile Doğu Anadolu'dan 97 (Erzurum'dan 36, Muş'tan 33, Iğdır'dan 28) ve Güneydoğu Anadolu'dan 45 (Mardin'den 29, Diyarbakır'dan 16) keçi olmak üzere toplam 819 hayvandan EDTA'lı tüplere kan örneği alınmıştır. Bu örneklerden toplam 795 (656 koyun ve 139 keçi) sürme kan frotisi hazırlanmıştır. Mardin ilinde theileriosisden şüpheli 27 koyundan ayrıca lenf yumrusu biyopsi materyali alınarak lenf frotisi hazırlanmıştır. Muş ve Malatya illerinde, kan örneği alınan hayvanlar üzerinden 620 adet kene numunesi toplanmıştır. Çalışmanın yürütüldüğü odaklar ile bu odaklardan toplanan numune sayıları ve odaklara göre dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

4.2. Laboratuvar Çalışmaları

Bu bölüm, kandan uygun DNA ekstraksiyon metodunun belirlenmesi, *T. ovis* ve *T. lestoquardi*'ye spesifik primerlerin tespit edilmesi, PCR metodunun standardizasyonu, kontrol DNA örneklerinin temini, *T. ovis* primerlerinin spesifite ve sensitivitesinin belirlenmesi, sahadan toplanan kanların *T. ovis* ve

Tablo 1. Çalışmanın yürütüldüğü odaklar ile bu odaklarda koyun ve keçilerden toplanan örnek sayıları ve odaklara göre dağılımı.

Odak	Kan Örneği			Kan Frotisi			Lenf	Kene		
	Koyun	Keçi	Toplam	Koyun	Keçi	Toplam	Frotisi Koyun	Koyun	Keçi	Toplam
Diyarbakır	121	16	137	120	16	136	0	0	0	0
Mardin	112	29	141	110	28	138	27	0	0	0
Malatya	46	0	46	46	0	46	0	148	0	148
Muş	67	33	100	65	33	98	0	383	89	472
Erzincan	119	0	119	112	0	112	0	0	0	0
Erzurum	125	36	161	119	34	153	0	0	0	0
Iğdır	87	28	115	84	28	112	0	0	0	0
Toplam	677	142	819	656	139	795	27	531	89	620

T. lestoquardi yönünden mikroskopik bakı ve PCR ile incelenmesi, koyun ve keçilerden toplanan kenelerin tür identifikasyonlarının yapılmasını kapsamaktadır.

4.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Koyun ve keçilerden EDTA'lı tüplere alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirilen kanlardan total DNA ekstraksiyonu, Clausen ve ark.(24)'nın bildirdiği şekilde yapılmıştır. Buna göre, 125 µl kan 250 µl lysis buffer (0,32 M Sakkaroz, 0,01 M Tris, 0,005 M MgCl, % 1 Triton X – 100, pH 7.52) ile 1,5' µl'lik ependorf tüplerde karıştırılarak, 15-30 saniye vortekslendikten sonra, 13.000 devirde 1 dk. santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı (süpernatant) dikkatli bir şekilde atıldıktan sonra, dipte kalan çöküntü (pelet) üzerine yine aynı lysis bufferdan 250 µl eklenerek, yıkama işlemi 3 defa tekrarlanmıştır. Yıkama işleminin tamamlanmasından sonra, pelet üzerine 250 µl PCR buffer [50 mM KCl, 10mM Tris-HCl, % 1 Triton X – 100, (pH 8.3), 50 µg/ml Proteinase K] ilave edilmiştir. PCR buffer ilave edilen karışım, 56°C'de 1 saat inkube edildikten sonra, 96°'de 10 dk su banyosunda kaynatılarak Proteinase K'nın inaktivasyonu sağlanmıştır. Hazırlanan DNA örnekleri, PCR'da kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.2.2. *Theileria ovis* ve *Theileria lestoquardi* Primerleri

Koyun ve keçilerden alınan kanlardan ekstrakte edilen tüm DNA örnekleri, *T. ovis* ve *T. lestoquardi*'nin varlığı yönünden PCR'da amplifikasyona tabi tutulmuştur. Bu çalışmada kullanılan, *T. ovis* ve *T. lestoquardi* primerleri ile bunlara ait nükleotid dizilimleri, çoğaltılan gen ile bu bölgenin uzunluğu ve primerlerin ilk defa kullanıldığı kaynak Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan *Theileria ovis* ve *Theileria lestoquardi* primerleri.

Primer	Parazit	Gen Bölgesi	Nükleotid Dizilimi (5' – 3')	Ürün Büyüklüğü (bp)	Literatür
Dış primerler					
TSsr 170F	<i>Theileria ovis</i>	18S SSU rRNA	TCGAGACCTTCGGGT	520	Bu çalışmada oluşturulmuştur.
TSsr 670R			TCCGGACATTGTAAAACAAA		
İç primerler					
TSsr 250FN	<i>Theileria ovis</i>	18S SSU rRNA	CGCGTCTTCGGATG	399	Bu çalışmada oluşturulmuştur.
TSsr 630RN			AAAGACTCGTAAAGGAGCAA		
Forwad primer	<i>Theileria lestoquardi</i>	30 kDA'lık msp	GTGCCGCAAGTGAGTCA	785	Kırvar ve ark. (1998) (61).
Reverse Primer			GGACTGATGAGAAGACGATGAG		

DNA örneklerinin, *T. lestoquardi* yönünden incelenmesinde, parazitin 30 kDa'luk merozoit yüzey antijenini kodlayan genin 785 baz çifti (bp) uzunluğundaki bölümünü amplifiye eden primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. Bu primerlerin, daha önce yapılan başka bir araştırmada *T. lestoquardi*'yi spesifik olarak amplifiye ettiği bildirilmiştir (61). Örneklerin *T. ovis* yönünden incelenmesinde ise test iki aşamalı PCR (nested PCR) olarak yapılmıştır. İlk aşamada, *T. ovis*'in 18S SSU rRNA geninin 520 bp uzunluğundaki bölümünü amplifiye eden TSsr 170F ve TSsr 670R primerleri (dış primerler), ikinci aşamada ise bu bölge içerisinde kalan 399 bp uzunluğundaki bölümü amplifiye eden TSsr 250FN ve TSsr 630RN primerleri (iç primerler) kullanılarak PCR yapılmıştır. *T. ovis* Erzincan koyun izolatına ait 18S SSU rRNA (Genbank No: AY508453) gen dizisi esas alınarak belirlenen bu primerler, ilk defa bu çalışmada kullanılmıştır. Yine bu primerlerin, *T. ovis*, *T. lestoquardi*, *T. annulata*, *T. parva*, *T. buffeli* ve *B. ovis*'e karşı spesifitesi ve *T. ovis*'i amplifiye etmedeki sensitivitesi bu çalışma ile ortaya konmuştur. *T. ovis*'e optimal primer bağlanma bölgelerinin belirlenmesi amacıyla EMBL, GenBank ve DDBJ bilgi bankalarında bulunan diğer *Theileria* türlerine ait DNA dizilimleri kullanılarak muhtemel primer bağlanma bölgeleri belirlenmiştir. DNA dizisi sıralanması ve uyuşumu (alignment) National Center for Biotechnology Information web sitesindeki BLAST algoritmi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) ile sağlanmıştır.

4.2.3. PCR ve PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu MJ Minicycler (England) cihazında gerçekleştirilmiştir. Toplam 50 µl hacimde hazırlanan PCR karışımına, 125 µM

dNTP miks, 1,25 U Taq DNA polymerase enzimi, 5 mM MgCl₂, 1X PCR Buffer (750 mM Tris-HCl (pH 8,8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, % 0,1 Tween 20), *T. lestoquardi* ya da *T. ovis*'e spesifik primer çiftlerinin her birinden 2,5 µl (20 pm/µl) ve hedef DNA'dan (template) 5 µl ilave edilmiştir. PCR karışımı, 50 µl mineral yağ ile kaplandıktan sonra amplifikasyona tabi tutulmuştur. Birinci aşama PCR'da elde edilen ürünlerin bir kısmı (25 µl) sonuçları görüntülemek amacıyla jel elektroforezde kullanılırken, bir kısmı da (5 µl) 1:20 oranında sulandırılmış ve nested PCR'da template olarak kullanılmıştır. Sadece birinci aşama PCR testi sonucunda negatif çıkan örneklerde nested PCR yapılmıştır.

Theileria lestoquardi-spesifik PCR şartları, ön denaturasyon ve son ekstensiyon dışında Kırvar ve ark.(61)'nin bildirdiği şartlarda yapılmıştır. Buna göre, reaksiyon 40 siklus olarak gerçekleştirilmiş ve her siklus 94 °C'de 1 dk. denaturasyon, 65 °C'de 1 dk. hibridizasyon ve 72 °C'de 1 dk. sentez aşamasından oluşmuştur. *T. ovis*-spesifik PCR ise 30 siklus olarak yapılmış ve her siklus 94 °C'de 30 sn. denaturasyon, 55 °C'de 30 sn. hibridizasyon ve 72 °C'de 2 dk. sentez aşamasından oluşmuştur. Ayrıca, hem *T. lestoquardi*-spesifik PCR'da, hem de *T. ovis*-spesifik PCR'da, 94 °C'de 5 dk ön denaturasyon ve 72 °C'de 10 dk. son ekstensiyon yapılmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforeze tabi tutulmuş, % 1,6'lık agarose jel hazırlandıktan sonra, 25 µl PCR ürünü, 5 µl yükleme solüsyonu (Loading Dye) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez işlemi Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tampon solüsyonu kullanılarak jel tankında 90 voltta 1 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra jel, ethidium bromide (10mg/ml) ile 30 dk boyanıp, UV transilluminatörde

spesifik bantların varlığı yönünden incelenmiştir. Bantların moleküler ağırlığını saptamak için 100 bp'lik marker kullanılmıştır. PCR ürünlerinin jel elektroforezi sonucunda, 785 bp'lik bantlar *T. lestoquardi*'nin, 520 (ilk PCR) ve 399 (nested PCR) bp'lik bantlar ise *T. ovis*'in göstergesi olarak kabul edilmiştir.

Metodun herhangi bir aşamasında oluşabilecek muhtemel kontaminasyonları belirlemek için, hem DNA ekstraksiyonu aşamasında hem de PCR aşamasında pozitif ve negatif kontroller kullanılmıştır. Negatif kontrollerde DNA amplifikasyonunun oluşmaması, işlemin kontaminasyondan arı olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

4.2.4. Kontrol DNA Örnekleri

Theileria ovis, *B. ovis* ve *T. annulata* için pozitif kontrol olarak, daha önce tarafımızdan yapılan çalışmalarda (2, 4) sekans analizi (*T. ovis*, AY508453; *B. ovis*, AY998123; *T. annulata*, AY508463) ile tanımlanmış ve stoklarımızda mevcut olan DNA örnekleri kullanılmıştır. *T. lestoquardi*, *T. parva* ve *T. buffeli*'ye ait pozitif kontrol DNA örnekleri ise sırası ile, Dr. Jabbar Ahmed (Immunology and Cell Biology, Research Center, Borstel Germany), Dr. Dirk Geysen (Department of Animal Health Institute of Tropical Medicine, Nationalestraat, Belgium) ve Dr. Sonia Almeria de la Merced'den (Department of Parasitology, Veterinary School, Autonomous University of Barcelona, Spain) sağlanmıştır.

Negatif kontrol DNA örneği elde etmek için, 1 aylık kuzudan kan alınmış ve bu kandan yukarıda belirtildiği şekilde DNA ekstrakte edilmiştir. Bu DNA, Allsoopp ve ark. (10) tarafından geliştirilen ve bütün *Theileria* türlerini çoğaltan

989 (5'-AGTTTCTGACCTATCAG-3') ve 990 (5'-TTGCCTTAAACTTCCTTG-3') primerleri kullanılarak PCR'da amplifikasyona tabi tutulmuştur. Reaksiyon sonucunda, *Theileria* türlerinin varlığını gösterecek herhangi bir amplifikasyon ürünü oluşmamıştır. Böylece bu örneğin, *Theileria* parazitleri yönünden ari olduğu kabul edilmiş ve bu çalışma süresince gerek DNA ekstraksiyonunda ve gerekse PCR testinde negatif kontrol DNA örneği olarak kullanılmıştır. Ayrıca bu kan, *T. ovis*'in teşhisine yönelik olarak geliştirilen PCR metodunun sensitivitesinin belirlenmesi aşamasında, parazitemi oranı bilinen enfekte kanın dilüe edilmesinde de kullanılmıştır.

4.2.5. *Theileria ovis* Primerlerinin Spesifitesi ve Sensitivitesinin Belirlenmesi

Koyun ve keçilerde *T. ovis*'in spesifik teşhisine yönelik olarak ilk defa bu çalışmada dizayn edilen primer dizileri, önce bilgisayar ortamında BLAST programı uygulanarak gen bankasındaki mevcut bütün sekanslara karşı test edilmiştir. Daha sonra laboratuvarında, *T. ovis*, *T. lestoquardi*, *T. annulata*, *T. parva*, *T. buffeli* ve *B. ovis* pozitif kontrol DNA'ları kullanılarak, TSsr 170F/TSsr 670R ve TSsr 250FN/TSsr 630RN primerleri ile PCR yapılmış ve primerlerin bu parazitleri çoğaltıp çoğaltmadığı test edilmiştir. Bu işlemde önce, kontrol DNA örnekleri söz konusu parazit DNA'larının varlığını ve metodun çalıştığını göstermek amacıyla *Theileria* ve *Babesia* türlerini çoğaltan 989/990 ve 5-22F (5'-GTTGATCCTGCCAGTAGT - 3') / 1661 R (5'-AACCTTGTTACGACTTC TC - 3') genel primerler kullanılarak (10, 18) PCR'a tabi tutulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri jel elektroforezde yürütülmek suretiyle beklenen bantlar gözlenmiş ve resimleri alınmıştır.

Theileria ovis'in spesifik teşhisine yönelik olarak geliştirilen metodun paraziti belirleme limitini (sensitivite) tespit etmek için, *T. ovis* ile enfekte olduğu PCR ve sekans analizi ile ortaya konan enfekte koyun kanı kullanılmıştır. Enfekte kandan hazırlanan sürme frotilerde önce kandaki parazitemi oranı hesaplanmıştır. Bu hesaplama, 200 mikroskop sahasında bulunan *Theileria* piroplasmlarının sayısının, 200 mikroskop sahasındaki toplam eritrosit sayısına oranlamasıyla yapılmıştır. Parazitemi oranı tespit edilen enfekte kan, 1 aylık steril bir kuzudan elde edilen ve negatif kontrol olarak kullanılan kan ile 10'un katları şeklinde sulandırılarak % 10⁻², % 10⁻³, % 10⁻⁴, % 10⁻⁵, % 10⁻⁶, % 10⁻⁷ ve % 10⁻⁸ basamaklarındaki dilüsyonlar elde edilmiş ve yukarıda bahsedildiği gibi bu kanlardan DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Dilüe kanlardan ekstrakte edilen DNA'lar PCR'da template olarak kullanılmış ve gerek ilk PCR ve gerekse nested PCR sonuçları gözlenmek suretiyle, metodun paraziti belirleme eşiği ve bunun parazitemi oranı olarak karşılığı hesaplanmıştır.

4.2.6. PCR'da Kullanılan Ayıraçlar

4.2.6.1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayıraçlar

Lysis Buffer Solüsyonu

0,32 M	Sakkaroz (ADR)
0,01 M	Tris (Sigma, St. Louis, MO, US)
0,005 M	MgCl (Sigma, St. Louis, MO, US)
% 1	Triton X – 100 (Sigma, St. Louis, MO, US)
	pH 7.52

PCR Buffer Solüsyonu

50 mM	KCl (Sigma, St. Louis, MO, US)
10mM	Tris-HCl (1 M, Sigma, St. Louis, MO, US)
% 1	Triton X – 100
	pH 8.3

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

1 ml'inde 100 µg olacak şekilde hazırlandı.

4.2.6.2. PCR Analizinde Kullanılan Ayırıcılar

10 X PCR Buffer (MBI Fermentas, Lithuania)

750 mM Tris-HCl (pH 8,8; 25 °C)

200 mM (NH₄)₂SO₄

% 0,1 Tween 20

Her PCR numunesi için 5 µl kullanıldı.

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

Her PCR numunesi için 5 µl kullanıldı.

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

Steril distile su kullanılarak 1,25 mM yoğunlukta hazırlandı.

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

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

Primerler (İontek, İstanbul, Türkiye)

Çalışmada kullanılan primerlerin tamamı İontek firmasından temin edildi. Primerler PCR'da her numune için ortalama 15-25 pmol olacak şekilde sulandırıldı.

Mineral Oil (Sigma, St. Louis, MO, US)

Her PCR numunesi için 50 µl kullanıldı.

4.2.6.3. Elektroforez İşleminde Kullanılan Ayıraçlar

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

Tris 54,4 g

Borik Asit 27,2 g

EDTA 4,6 g

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

Agarose LE, (Promega, Madison, US)

Agarose jel 1X TBE ile hazırlandı.

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

1/6 oranında sulandırıldı ve 5 µl kullanıldı.

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

1/6 oranında sulandırıldı ve her 15 µl PCR ürünü için 5 µl kullanıldı.

Ethidium Bromide (AppliChem GmbH, Dramstadt, Germany)

Ethidium bromide solusyonundan 1 µl alınarak distile su ile 30 µl'ye tamamlandı. Agorase jeli boyama için 200 µl distile suya 400 µl ethidium bromide katıldı.

4.2.7. Frotilerin Mikroskopik Muayenesi

EDTA'lı kanlardan hazırlanan kan frotileri ile lenf yumrusu biyopsi materyalinden hazırlanan lenf frotileri, laboratuvarında metil alkol ile beş dakika tespit edildikten sonra, % 5'lik Giemsa solüsyonu ile 30 dk. boyanmıştır. Frotiler immersion objektifte (X 1000) *Theileria*'nın piroplasm ve şizont formları yönünden incelenmiştir. Mikroskopik bakıda, her frotide en az 200 mikroskop sahası incelenmiş ve tek etkenin görülmesi durumunda dahi froti pozitif kabul edilmiştir.

4.2.8. Kenelerin Teşhisi

Koyun ve keçiler üzerinden toplanan ergin kenelerin, stereo mikroskop altında morfolojik özellikleri incelenmiş ve Estrada-Pena ve ark.(33)'nın bildirdiği teşhis anahtarına göre tür tayinleri yapılmıştır. Teşhis edilen türler ile bu türlerin cinsiyetleri ve sayıları ilgili protokole kaydedilmiştir.

4.3. İstatistiksel Analiz

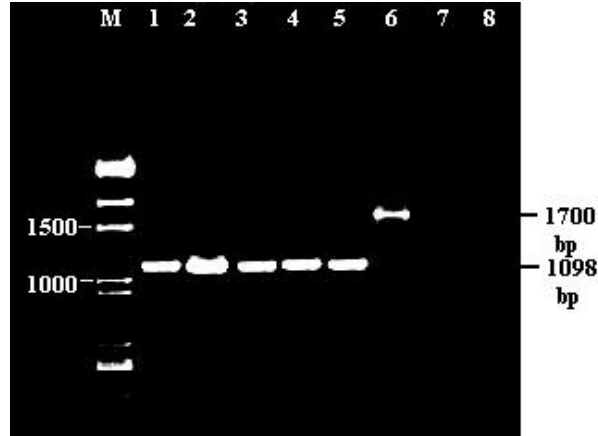
Oranlar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için χ^2 testi kullanılmış ve % 5 (0,05) düzeyindeki bir farklılık istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Bu testler Epi info programı ile yapılmıştır.

5. BULGULAR

5.1. *Theileria ovis* Primerlerinin Spesifite ve Sensitivitesi

Theileria ovis 18S SSU rRNA gen sekansı esas alınarak dizayn edilen TSsr 170F/TSsr 670R (dış primerler) ve TSsr 250FN/TSsr 630RN (iç primerler) primer dizilerinin DNA dizisi sıralanmasının ve uyuşumunun (alignment), National Center for Biotechnology Information web sitesindeki BLAST algoritmi analizi sonucunda, sadece *T. ovis*'e spesifik olduğu belirlenmiştir.

Bu primerlerin spesifitesini belirlemeye yönelik *T. ovis*, *T. lestoquardi*, *T. annulata*, *T. parva*, *T. buffeli* ve *B. ovis*'e ait pozitif kontrol DNA'ları kullanılarak yapılan deneye başlamadan önce, bu pozitif kontrol örneklerinde parazitlerin varlığını ve metodun doğruluğunu göstermek için, *Theileria* ve *Babesia* türlerini amplifiye eden genel primerler ile PCR yapılmış ve sonuçları Şekil 2'de verilmiştir.

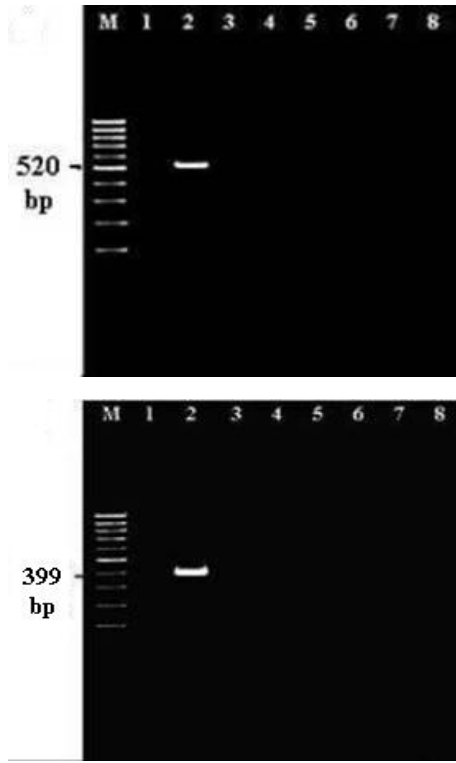


Şekil 2. *Theileria* ve *Babesia* türlerini amplifiye eden genel primerler (989/990, 5-22F/1661R) ile yapılan PCR sonuçları.

M: Marker, 1: *T. ovis*, 2: *T. lestoquardi*, 3: *T. annulata*, 4: *T. parva*, 5: *T. buffeli*, 6: *B. ovis*, 7: negatif kontrol (koyun kanı), 8: negatif kontrol (distile su).

Şekil 2’de görüldüğü gibi *Theileria* ve *Babesia* türlerini çoğaltan genel primerler ile yapılan PCR analizi sonucunda, *T. ovis*, *T. lestoquardi*, *T. annulata*, *T. parva* ve *T. buffeli*’ye ait 1098 bp’lik, *B. ovis*’e ait 1700 bp’lik amplifikasyon ürünleri elde edilmiştir.

Kontrol DNA örneklerinin template olarak kullanıldığı *T. ovis*’e spesifik dış (TSsr 170F ve TSsr 670R) ve iç (TSsr 250FN ve TSsr 630RN) primerler ile yapılan PCR ve nested PCR sonuçları ise Şekil 3 - A ve B’de verilmiştir.



A. *T. ovis* spesifik TSsr 170F/TSsr 670R primerleri (dış primerler) ile yapılan ilk PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

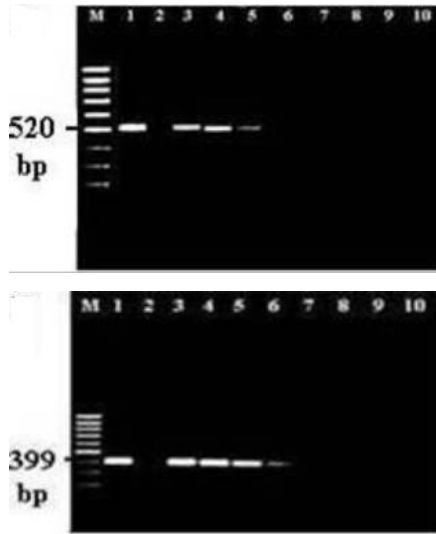
B. *T. ovis* spesifik TSsr 250FN/TSsr 630RN primerleri (iç primerler) ile yapılan nested PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

Şekil 3 – A, B. *T. ovis* spesifik primerlerle yapılan PCR sonuçları.

M: 100 bp’lik marker (100-1.000 bp), 1: negatif kontrol (distile su), 2: *T. ovis*, 3: *T. lestoquardi*, 4: *T. annulata*, 5: *T. parva*, 6: *T. buffeli*, 7: *B. ovis*, 8: Koyun kanı (*Theileria* spp. negatif).

Şekil 3 - A ve B'den anlaşılacağı gibi, hem ilk PCR'nda hem de nested PCR'da sadece *T. ovis*'e ait 520 (ilk PCR) ve 399 (nested PCR) bp'lik amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. Buna karşılık *T. lestoquardi*, *T. annulata*, *T. parva*, *T. buffeli*, *B. ovis*'e ait kontrol DNA'ları ile negatif kontrollerde PCR amplifikasyonu gerçekleşmemiştir. Bu sonuçlar *T. ovis*'in teşhisine yönelik olarak dizayn edilen hem dış hem de iç primerlerin, sadece bu paraziti çoğalttığını göstermiştir.

Metodun sensitivitesini belirlemek için, % 10^{-2} , % 10^{-3} , % 10^{-4} , % 10^{-5} , % 10^{-6} , % 10^{-7} ve % 10^{-8} dilüsyonlarındaki enfekte kandan ekstrakte edilen DNA'lar ile yapılan PCR ve nested PCR sonuçları Şekil 4 - A ve B'de verilmiştir.



A. *T. ovis* spesifik TSsr 170F/TSsr 670R primerleri (dış primerler) ile yapılan ilk PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

B. *T. ovis* spesifik TSsr 250FN/TSsr 630RN primerleri (iç primerler) ile yapılan nested PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

Şekil 4 – A, B. *Theileria ovis* ile enfekte koyun kanının seri dilüsyonlarından ekstrakte edilen DNA'larla yapılan PCR sonuçları.

M: 100 bp'lik marker (100-1.000 bp), 1: pozitif kontrol, 2: negatif kontrol (distile su), 3-9: % 10^{-2} , % 10^{-3} , % 10^{-4} , % 10^{-5} , % 10^{-6} , % 10^{-7} , % 10^{-8} parazitemili *T. ovis* ile enfekte kan, 10: Koyun kanı (*Theileria* spp. negatif).

Şekil 4 A ve B'den de anlaşılacağı gibi, *T. ovis* ilk aşama PCR'da en düşük % 10^{-4} (Şekil 4 - A), nested PCR'da ise en düşük % 10^{-5} (Şekil 4 - B) parazitemili kanda belirlenmiştir. Böylece ilk aşama PCR'da milyonda bir, nested PCR'da 10 milyonda bir enfekte eritrositte *T. ovis*'in amplifiye edilebildiği ortaya konmuştur.

5.2. Mikroskopik Muayene

Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde *Theileria* spp. yönünden incelenen koyun ve keçilerin mikroskopik bakı sonuçları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde koyun ve keçilerden hazırlanan kan frotilerinin mikroskopik bakı sonuçları.

Odak	Koyun			Keçi		
	Numune sayısı	Pozitif numune sayısı	%	Numune sayısı	Pozitif numune sayısı	%
Diyarbakır	120	21	17,50	16	1	6,25
Mardin	110	27	24,54	28	1	3,57
Malatya	46	6	13,04	-	-	-
Muş	65	16	24,62	33	1	3,03
Erzincan	112	30	26,78	-	-	-
Erzurum	119	12	10,08	34	0	0
Iğdır	84	8	9,52	28	1	3,57
Toplam	656	120	18,29	139	4	2,87

Tablo 3'ten izlenebileceği gibi 656 koyunun 120 (% 18,29)'sinde, 139 keçinin 4 (% 2,87)'ünde mikroskopik muayene ile *Theileria* spp. piroplasm formları tespit edilmiştir.

Koyunlarda en yüksek pozitiflik, % 26,78 oranıyla Erzincan'da görülmüş, bunu Muş (% 24,62), Mardin (% 24,54), Diyarbakır (% 17,50), Malatya (% 13,04) ve Erzurum (% 10,08) izlemiştir. En düşük pozitiflik ise Iğdır'da (% 9,52) belirlenmiştir. Keçilerde en yüksek pozitiflik % 6,25 oranıyla Diyarbakır'da tespit edilmiş, bunu Iğdır (% 3,57), Mardin (% 3,57) ve Muş (% 3,03) izlemiştir. Erzurum'da muayene edilen 34 keçinin hiç birinde etkenin piroplasm formuna rastlanmamıştır. Erzincan ve Malatya illerinde keçilerden örnek alınamamıştır. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde mikroskopik muayene sonucunda theileriosis'e yakalanma prevalansının koyunlarda % 18,29, keçilerde % 2,87 olduğu anlaşılmıştır. Koyun ve keçilerdeki mikroskopik bakı sonuçları istatistiksel analize tabi tutulduğunda, *Theileria* spp. piroplasm taşıyıcılığının koyunlarda keçilere göre daha yüksek olduğu belirlenmiş ve ortaya çıkan farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).

Mardin'de *Theileria* enfeksiyonundan şüpheli 27 koyundan elde edilen lenf frotilerinin mikroskopik muayenesinde, etkenin şizont formlarına rastlanmazken, bu hayvanlara ait kan frotilerinin 8 (% 29,62)'inde parazitin piroplasm formları tespit edilmiştir.

5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Doğu ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde koyun ve keçi kanlarından ekstrakte edilen DNA'lar, *T. ovis* spesifik primerler kullanılarak iki aşamalı PCR ile analiz edilmiş ve sonuçlar Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4'ten izlenebileceği gibi ilk aşama PCR sonucunda incelenen 677 koyunun 308 (% 45,49)'inde, 142 keçinin 9 (% 6,34)'unda pozitif amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. Bu ürünlerle yapılan nested PCR sonucunda, koyunların 398 (% 58,78)'inde, keçilerin 16 (% 11,26)'sında pozitif amplifikasyon ürünü oluşmuştur.

Aynı tablo'dan nested PCR ile elde edilen sonuçların odaklara göre dağılımına bakıldığında; koyunlarda en yüksek pozitiflik % 86,57 oranıyla Muş'ta elde edilmiş, bunu Mardin (% 84,82), Erzincan (% 70,59), Diyarbakır (% 69,42), Malatya (% 52,17) ve Iğdır (% 34,48) illeri izlemiştir. En düşük pozitiflik % 18,40 oranıyla Erzurum'da görülmüştür. Keçilerde ise en yüksek pozitiflik % 27,59 oranıyla Mardin'de elde edilmiş, bunu Muş (% 15,15), ve Iğdır (% 7,14) izlemiştir. En düşük pozitiflik % 6,25 oranıyla Diyarbakır'da görülmüştür. Erzurum'da 36 keçiden elde edilen DNA örneklerinin hiç birinde, gerek ilk aşama PCR'da ve gerekse nested PCR'da *T. ovis*'in varlığını gösteren pozitif amplifikasyon ürünü oluşmamıştır.

Mikroskopik bakıda olduğu gibi, PCR ile de *T. ovis* yönünden elde edilen pozitiflik oranı koyunlarda keçilere göre daha yüksek bulunmuş, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya çıkmıştır ($p < 0,01$).

Tablo 4. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde *Theileria ovis* yönünden incelenen koyun ve keçilerin PCR ve nested PCR sonuçları.

Odak	Koyun					Keçi				
	Numune sayısı	PCR		Nested PCR		Numune sayısı	PCR		Nested PCR	
		Pozitif numune sayısı	%	Pozitif numune sayısı	%		Pozitif numune sayısı	%		
Diyarbakır	121	66	54,54	84	69,42	16	1	6,25	1	6,25
Mardin	112	74	66,07	95	84,82	29	4	13,79	8	27,59
Malatya	46	16	34,78	24	52,17	-	-	-	-	-
Muş	67	44	65,67	58	86,57	33	3	9,09	5	15,15
Erzincan	119	65	54,62	84	70,59	-	-	-	-	-
Erzurum	125	21	16,80	23	18,40	36	0	0	0	0
İğdır	87	22	25,29	30	34,48	28	1	3,57	2	7,14
Toplam	677	308	45,49	398	58,78	142	9	6,34	16	11,26

Theileria ovis yönünden incelenen DNA örnekleri *T. lestoquardi* spesifik primerler kullanılarak PCR analizine tabi tutulmuş, örneklerin hiç birinde *T. lestoquardi*'ye ait pozitif amplifikasyon ürünü oluşmamıştır.

Mardin ilinde klinik theileriosis şüphesi ile kan örneği, perifer kan frotisi ve superficial lenf yumrularından hazırlanan frotilerin incelenmesinde; perifer kan frotilerinin % 29,62'sinde *Theileria* piroplasm formlarına rastlanmıştır, lenf frotilerinin hiç birinde parazitin şizontlarına rastlanmamıştır. Yine aynı koyunlardan alınan kan örneklerinin % 85,18'i nested PCR ile *T. ovis* yönünden pozitif bulunmuş, bu örneklerin hiç birinde PCR ile *T. lestoquardi* amplifiye edilememiştir.

Bu çalışmada gerek mikroskopik bakı ve gerekse PCR sonucu pozitif olan koyun ve keçilerin hiç birinde theileriosise ilişkin hiçbir klinik bulguya rastlanmamıştır.

Koyun ve keçilerden EDTA'lı kan ve kan frotisi alınan 795 örneğin PCR ve mikroskopik bakı ile ilgili karşılaştırmalı sonuçları odaklara göre Tablo 5'te, buna ait toplu sonuçlar ise Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 5 ve 6'dan anlaşılacağı gibi, kan frotilerinin mikroskopik bakısında 656'sı koyun ve 139'u keçi olmak üzere toplam 795 hayvanın 124 (%15,60)'ünde *Theileria* spp. piroplasmaları görülmüştür. Aynı hayvanların 404 (% 50,82)'ü nested PCR ile pozitif bulunmuştur (Tablo 5-6). Mikroskopik bakıyla pozitif bulunan 124 örneğin 123'ünde PCR ile *T. ovis* amplifiye edilmiştir. Sadece, Muş'ta bir keçide mikroskopik bakıda piroplasm formları görülmesine rağmen, PCR ile *T. ovis* amplifiye edilememiştir (Tablo 5-6). Bu örnek *T. lestoquardi* yönünden PCR ile amplifiye edilmeye çalışılmış, ancak negatif sonuç alınmıştır.

Tablo 5. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde koyun ve keçilerden alınan örneklerin mikroskopik bakı, PCR ve nested PCR sonuçlarının odaklara göre karşılaştırılması.

Odak	Nested PCR, PCR, Mikroskopik Bakı								Toplam
	+,+,+	+,+,-	+,-,-	-,,-,-	-,,-+	-,+,+	-,+,-	+,-,+	
Diyarbakır	22	44	18	52	0	0	0	0	136
Mardin	28	50	24	36	0	0	0	0	138
Malatya	6	10	8	22	0	0	0	0	46
Muş	16	29	16	36	1	0	0	0	98
Erzincan	30	34	16	32	0	0	0	0	112
Erzurum	12	9	2	130	0	0	0	0	153
İğdır	9	12	9	82	0	0	0	0	112
Toplam	123	188	93	390	1	0	0	0	795

Tablo 6. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde koyun ve keçilerden alınan örneklerin mikroskopik bakı, PCR ve nested PCR sonuçlarının karşılaştırılması.

	Nested PCR		Toplam
	-	+	
MB - ; PCR -	390	93	483
MB - ; PCR +	0	188	188
MB + ; PCR -	1	0	1
MB + ; PCR +	0	123	123
Toplam	391	404	795

+: Pozitif örnek sayısı, -: Negatif örnek sayısı, MB: Mikroskopik bakı

Mikroskopik bakı negatif 188 örnekte, PCR ile *T. ovis* amplifiye edilmiştir. Diğer taraftan ilk aşama PCR ile negatif sonuç alınan 93 örnekte, nested PCR ile pozitif sonuç alınmıştır (Tablo 6). Buna göre nested PCR altın standart olarak

değerlendirildiğinde, ilk aşama PCR'in spesifitesinin % 100, sensitivitesinin ise % 76,98 olduğu ortaya çıkmıştır.

Mikroskopik bakıya göre PCR, koyun ve keçilerde *T. ovis*'in belirlenmesinde daha duyarlı bulunmuş, iki testin sonuçları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya çıkmıştır ($p<0,01$). Yine *T. ovis*'in belirlenmesinde nested PCR'in, tek aşamalı PCR'a göre daha duyarlı olduğu belirlenmiş, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).

Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde *T. ovis*'in prevalansı mikroskopik bakı, tek aşamalı PCR ve nested PCR ile elde edilen sonuçlar dikkate alındığında sırası ile % 15,60 (124/795), % 39,12 (311/795), % 50,82 (404/795), bu üç testin herhangi biri ile pozitif bulunan hayvan sayısı dikkate alındığında koyun ve keçilerde theileriosisin prevalansı % 50,94 (405/795) olarak belirlenmiştir.

5.4. Kene Türleri

Bu çalışmaya paralel olarak kan örnekleri alınan koyun ve keçilerdeki olası kene türlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak Muş ve Malatya illerinde koyunlardan 531 ve keçilerden de 89 olmak üzere toplam 620 adet erişkin kene toplanmıştır.

Toplanan kenelerin 521'inin *R. bursa* ve 99'ununda *R. sanguineus* olduğu görülmüştür. *R. bursa*'ların 274'inin erkek, 247'sinin dişi, *R. sanguineus*'ların ise 58'inin erkek, 41'inin dişi olduğu belirlenmiştir. Her iki türe de hem koyun ve hem de keçilerde rastlanmıştır. Koyunların daha çok *R. bursa*, keçilerin ise *R. sanguineus* ile enfeste olduğu ortaya çıkmıştır (Tablo 7).

Tablo 7. Muş ve Malatya yörelerinde koyun ve keçilerden toplanan kene türleri ve oranları.

Kene türü	Cinsiyet	Muş			Malatya	Toplam		
		Koyun	Keçi	T	Koyun	Koyun	Keçi	T
<i>R. bursa</i>	♂	189	12	201	73	262	12	274
	♀	175	9	184	63	238	9	247
	T	364	21	385	136	500	21	521
<i>R. sanguineus</i>	♂	12	41	53	5	17	41	58
	♀	7	27	34	7	14	27	41
	T	19	68	87	12	31	68	99
Toplam	♂	201	53	254	78	279	53	332
	♀	182	36	218	70	252	36	288
	T	383	89	472	148	531	89	620

6. TARTIŞMA

Koyun ve keçilerde theileriosis neden olan türler patojenite, vektör kene, yayılış ve biyolojik özellikler bakımından önemli farklılıklar gösterirler. Bu türlerden *Theileria* sp. China ve *T. lestoquardi*'nin oluşturduğu enfeksiyonlar yüksek morbidite ve mortalite ile seyrederken, *T. ovis* ve *T. seperata* subklinik enfeksiyonlara neden olmaktadır (68, 102).

Enfeksiyona karşı uygun kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde, theileriosis neden olan türlerin identifikasyonu ve özellikle subklinik enfeksiyonların insidens ve prevalanslarının saptanması büyük önem arz etmektedir.

Theileriosisin teşhisi, akut vakalarda klinik bulgular ile Giemsa ile boyanmış lenf ve kan frotilerinin mikroskopik muayenesi ile yapılmakta, subklinik enfeksiyonların belirlenmesinde ise mikroskopik muayene ve serolojik testlerden yararlanılmaktadır.

Subklinik hayvanlarda enfekte eritrosit oranı çok düşük ve piroplasm formların morfolojik özellikleri benzer olduğundan, mikroskopik muayene ile enfeksiyonun belirlenmesi ve tür identifikasyonu çok zordur. Serolojik testlerde de spesifik immun yanıtın zayıf olabilmesi, uzun süren portörlük durumlarında antikorların her zaman belirlenememesi ve *Theileria* türleri arasında çapraz reaksiyonların görülebilmesi gibi nedenlerden dolayı, yanlış negatif ve pozitif sonuçların ortaya çıkması gibi olumsuzluklar sözkonusudur (20, 46, 64, 83, 91).

Son yıllarda moleküler yöntemlerdeki gelişmelere paralel olarak, PCR gibi moleküler teşhis metotları Veteriner Parazitolojide de uygulama alanı bulmuş (5,

58, 60, 85, 92, 94, 98, 109), özellikle *Theileria* türlerinin ayırımı ve subkilinik enfeksiyonların teşhisinde güvenli bir yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır (21, 47, 75, 93, 100). Parazit DNA'sının amplifikasyonu esasına dayanan PCR, geleneksel metotlara göre büyük avantajlara sahiptir. Özellikle epidemiyolojik çalışmalarda, taşıyıcı hayvanların tespitinde yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olan bu metot tercih edilmektedir. Çünkü taşıyıcı hayvanlar, arakonakçı keneler için enfeksiyon kaynağıdır. Şimdiye kadar, *Theileria* sp. China, *T. lestoquardi*, *T. annulata* ve *T. parva* gibi *Theileria* türlerinin spesifik teşhisine yönelik PCR metodu geliştirilmiştir (61, 62, 79, 93). Bu çalışmada ilk defa *T. ovis*'in teşhisine yönelik spesifik bir nested PCR metodu geliştirilmiş ve sahada koyun ve keçilerden toplanan örneklerde metodun uygulanabilirliği ortaya konmuştur. Bu çalışmada kullanılan primerlerin, National Center for Biotechnology Information web sitesindeki BLAST algoritmi programı ile primer dizilerinin DNA dizisi sıralanması ve uyuşumu yönünden yapılan bilgisayar analizinde, *T. ovis*'e spesifik olduğu belirlenmiş ve bu primerlerin *T. lestoquardi*, *T. annulata*, *T. parva*, *T. buffeli* ve *B. ovis*'e ait pozitif kontrol DNA'larını amplifiye etmediği, buna karşılık *T. ovis*'in 18S SSU rRNA geninin 520 ve 399 bp'lik bir bölümünü spesifik olarak amplifiye ettiği PCR analizi ile laboratuvarında ortaya konmuştur.

Polimeraz zincir reaksiyonu ile çok düşük parazitemili kanda *Theileria* piroplazmalarını tespit etmek mümkündür. Bu bağlamda d'Oliveira ve ark. (28) *T. annulata*'yı (19 parazit/1 µl kan), Kırvar ve ark. (61) *T. lestoquardi*'yi (1 parazit/1 µl kan), Oura ve ark. (79) *T. parva*'yı (0,3 parazit/1 µl kan) yüksek bir duyarlılıkta teşhis etmişlerdir. Bu çalışmada *T. ovis* nested PCR ile % 10⁻⁵ parazitemili kanda amplifiye edilmiştir. Bu sensitivite değeri, 10 milyonda bir

enfekte eritrosite denk gelmektedir. Koyunlarda kandaki ortalama eritrosit sayısının 10 milyon/ μ l olduğu düşünülürse, *T. ovis* bu çalışmada nested PCR ile 1 parazit/1 μ l kan düzeyinde belirlenebilmiştir. Diğer bir deyişle, mikroskopik bakıda incelenen örneğin pozitif kabul edilebilmesi için, 200 mikroskop sahasında yaklaşık 60.000 eritrositin incelenmesi ve en az bir eritrositin enfekte olması yeterli görülmekte iken, nested PCR'ın kanda *T. ovis*'i belirlemede, mikroskopik bakıdan 166 kat daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç daha önce diğeri *Theileria* türlerine karşı geliştirilen PCR metotlarının (28, 61, 79) sensitivite değerleri ile benzerlik arz etmektedir.

Saha şartlarında theileriosisin teşhisinde mikroskopik bakı ve PCR metodu birlikte kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (28, 87, 106). Sanchez ve ark. (87), 214 sığırın mikroskopik bakı ile % 65,24'ünün, PCR ile % 78,04'inin *T. annulata* ile enfekte olduğunu belirlemiştir. Yine mikroskopik bakı ve PCR ile d' Oliviera ve ark. (28), 92 sığırın sırasıyla % 22 ve % 75'inde, Vatansver ve ark. (106) ise 147 sığırın % 31,3 ve % 61,2'inde *T. annulata* yönünden pozitif sonuç elde etmişlerdir. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde koyun ve keçilerde *Theileria* enfeksiyonunun araştırıldığı bu çalışmada, mikroskopik bakı ve PCR ile incelenen 795 örneğin sırasıyla % 15,60 ve % 50,82'sinde pozitif sonuç elde edilmiştir. Böylece diğeri çalışmalarda (28, 87, 106) olduğu gibi, bu çalışmada da theileriosisin teşhisinde PCR'ın mikroskopik bakıdan daha duyarlı olduğu ortaya çıkmıştır.

Tek aşamalı PCR'da amplifiye edilen bölge içerisinde tespit edilen ikinci bir çift primer belirleyerek yapılan nested PCR ile metodun duyarlılığı artırılabilir. Chang ve Pan (22), köpeklerde *Anapalsma platys*'in

teşhisinde, nested PCR'ın ilk PCR'dan 10, Martin ve ark. (69) ise 100 kat daha duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Basto ve ark. (15), African swine fever virusunun (ASFV) kenelerde tespitinde, nested PCR'ın ilk PCR'dan 10 kat daha duyarlı olduğunu ortaya koymuşlardır. Ogawa ve ark.(78)'da *Coxiella burnetii*'nin teşhisinde aynı sonucu elde etmişlerdir. Bu çalışmada, *T. ovis*'in teşhisinde nested PCR'ın, tek aşamalı PCR'dan 10 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Buna göre, özellikle epidemiyolojik çalışmalarda nested PCR'ın kullanılması durumunda daha sağlıklı sonuçların elde edileceği ortaya çıkmıştır. Nitekim bu çalışmada, ilk PCR ile 819 örneğin 317 (% 38,70)'sinde pozitif amplifikasyon ürünü elde edilirken, nested PCR ile aynı numunelerin 414 (% 50,55)'ünde pozitif sonuç alınmıştır.

Türkiye'de koyun ve keçilerde theileriosis'e hangi türlerin neden olduğu uzun süre tartışılmıştır. Konu ile ilgili ilk çalışma, Karacabey Harasında yapılmış ve kan frotilerinin mikroskopik muayenesi ile koyunlarda tespit edilen *Theileria* türünün *T. ovis* olduğu bildirilmiştir (65). Daha sonra, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinde postmortem olarak incelenen 14 koyun ve 1 keçide tespit edilen parazitler, *T. hirci* (*T. lestoquardi*) olarak tanımlanmıştır (16). Yine Orta Anadolu'da koyun ve keçilerde kan frotilerinin mikroskopik bakışı ile yapılan bir çalışmada, *T. ovis* (*T. recondita*) enfeksiyonları bildirilmiş (42), aynı yöntemle Türkiye genelini kapsayan başka bir çalışmada ise koyun ve keçilerde *T. ovis* enfeksiyonlarının belirlendiği, keçilerdeki parazitlerin *T. lestoquardi* olabileceği ifade edilmiştir (51). Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illeri ile Kayseri yöresinde yapılan çalışmalarda, koyun ve keçilerden hazırlanan kan frotilerinde tespit edilen parazitler, *Theileria* spp. olarak tanımlanmıştır (55, 81). Orta, Doğu

ve Güney Anadolu'da yapılan bir çalışmada, koyun ve keçilerde mikroskopik bakıda *Theileria* spp. piroplasm formları, kan serumlarında ise *T. ovis*'e karşı şekillenen antikorlar tespit edilmiştir. Aynı çalışmada bu bölgelerde koyun ve keçilerde *T. lestoquardi* enfeksiyonunun bulunmadığı rapor edilmiştir (91). Son olarak Erzincan'da koyunlardan elde edilen *Theileria* izolatlarının 18S SSU rRNA gen analizi yapılmış ve bunların *T. ovis* olduğu belirlenmiştir (4). Bu çalışmada, PCR metodu ile Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde koyun ve keçilerde *T. ovis*'in yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, kan frotilerinin mikroskopik bakısına göre Türkiye'de koyun ve keçilerde varlığı bildirilen *T. lestoquardi* (16, 51), bu çalışmada PCR ile amplifiye edilememiştir. Ayrıca theileriosisden şüpheli hayvanlardan elde edilen lenf frotilerinin mikroskopik bakısında, *Theileria* şizontlarına rastlanmamıştır. Türkiye'de koyun ve keçilerde *T. lestoquardi*'nin varlığı bildirilen çalışmalarda (16, 51), enfekte hayvanların hiç birinde parazitemi oranının yüksekliğinden, şizontların varlığından ve diğer klinik bulgulardan bahsedilmemiştir. Buna göre gerek bu çalışmada elde edilen bulgular ve gerekse Türkiye'nin geniş bir coğrafik bölgesinde yapılan araştırma (91) sonuçları değerlendirildiğinde, Türkiye'de koyun ve keçilerde *T. lestoquardi*'nin bulunmadığı, koyun ve keçilerde görülen *Theileria* etkeninin *T. ovis* olduğu anlaşılmaktadır.

Türkiye'de koyun ve keçi theileriosisi ile ilgili yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, enfeksiyonun yaygın olduğu belirlenmiştir. Mikroskopik bakı ile, Orta Anadolu'da klinik babesiosisli 579 koyunun % 18.26'sının, sağlıklı görünümlü 236 koyunun % 59'unun ve 77 keçinin % 31'inin *T. ovis* (*T. recondita*) ile enfekte olduğu bildirilmiştir (42). Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu

illerinde yapılan araştırmada, koyun ve keçilerin % 1-4'ünün kan frotilisinde *Theileria*'nın piroplasm formları belirlenmiştir (81). Yine kan frotilerinin mikroskopik bakısı ile Ege bۆlgesinde, muayene edilen koyunların % 27'sinde *T. ovis* (*T. recondita*) tespit edilmiştir (89). Aynı metotla Kayseri yۆresinde koyunların % 18,44'ünde, keçilerin ise % 6'sında etkenin piroplasm formlarına rastlanmıştır (55). Orta Anadolu, Doğu Anadolu ve Gۆneydoęu Anadolu bۆlgelerinde mikroskopik ve serolojik yۆntemlerle koyun ve keçi theileriosisi ile ilgili yapılan bir çalışmada, 687 koyunun % 37,55'inde *Theileria* piroplasmaları, % 60,26'sında anti-*T. ovis* antikoru saptanmıştır. Aynı çalışmada, 85 keçinin % 5,62'sinde piroplasm formları, % 8,99'unda ise anti-*T. ovis* antikoru belirlenmiştir (91). Doğu ve Gۆneydoęu Anadolu bۆlgelerinde yapılan bu araştırmada kan frotilerinin mikroskopik bakısı ile koyunların % 18,29'unda, keçilerin % 2,87'sinde *Theileria* piroplasmaları, nested PCR ile koyunların % 58,78'inde, keçilerin % 11,26'sında *T. ovis* enfeksiyonu tespit edilmiştir. Gerek bu çalışmada ve gerekse daha ۆnce yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar, farklı endemik ۆzelliklere sahip bۆlgelerde hastalığın prevalansında değişkenlik olmakla beraber, koyun ve keçilerde *T. ovis* tarafından oluşturulan enfeksiyonun Türkiye'nin hemen her bۆlgesinde yaygın olduğunu gۆstermiřtir.

Değişik metotlarla *T. ovis*'in yaygınlığını belirlemeye yۆnelik olarak yapılan çalışmalar, enfeksiyonun koyunlarda keçilere gۆre daha yۆksek olduğunu gۆstermiřtir. Makedonya'da, IFA testi ile yapılan serolojik çalışmada, 721 koyunun % 24,6'sında, 487 keçi'nin % 0,6'sında *T. ovis*'e karşı şekillenen antikorlar belirlenmiştir (82). Aynı yۆntemle İşpanya'da *T. ovis*'in seroprevalansı koyunlarda % 18,9, keçilerde % 0,89 olarak bildirilmiştir (35). Türkiye'nin farklı

bölgelerinde yapılan çalışmalarda koyunlardaki enfeksiyonun (% 18-60,26) keçilerdeki enfeksiyondan (% 6-31) yüksek olduğu ve sonuçların diğer ülkelerdeki sonuçlara benzer olduğu gözlenmiştir (42, 55, 91). Buna karşılık, Mısır'da, mikroskopik bakı ile 475 koyunun % 2,9'unda, 200 keçinin % 7,5'inde *T. ovis*'in piroplasm formları belirlenmiş ve enfeksiyonun keçilerde daha yüksek olduğu bildirilmiştir (70). Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yapılan bu çalışmada da diğer çalışmalardakilere benzer şekilde koyunlardaki enfeksiyon oranı (% 58,78), keçilere göre (% 11,26) daha yüksek bulunmuştur. *T. ovis*'in koyunlarda keçilere göre daha yüksek oranlarda görülmesi parazit, konak ve vektör kene ilişkisinden kaynaklanabileceği, bu bulguların aksine Mısır'da mikroskopik bakı ile yapılan çalışmada elde edilen sonucun ise mikroskopik bakı yönteminin dezavantajları ile izah edilebileceği kanaatine varılmıştır.

Parazitoloji alanında moleküler tekniklerin kullanımının bir faydası da birçok parazitin doğru adlandırılmasını, ya da tek parazit yerine birden çok genotipi içeren grup olduğunun anlaşılmasını sağlaması olmuştur. Son yıllara kadar Çin'de koyun ve keçilerde klinik theileriosise neden olan türün *T. lestoquardi* olduğu düşünülmüştür (108, 115). Ancak yapılan sekans analizleri sonucunda bu parazitin *T. lestoquardi* olmadığı anlaşılmış ve *Theileria* sp. China olarak isimlendirilmiştir (93). Daha sonraki çalışmalarda, bu türün *Theileria* sp. China 1, *Theileria* sp. China 2 olarak adlandırılan farklı iki genotipinin bulunduğu bildirilmiştir (92). Benzer şekilde İspanya'da koyunlarda sadece *T. ovis* enfeksiyonlarının varlığı bilinirken, yapılan sekans analizleriyle *Theileria* sp. OT1 ve *Theileria* sp. OT3 olarak isimlendirilen farklı iki genotipinin bulunduğu belirlenmiştir (75). Bu çalışmada, mikroskopik bakı ile *Theileria* piroplasmaları

tespit edilen bir keçide PCR ile ne *T. ovis* ve ne de *T. lestoquardi* ampilifiye edilememiştir. Ancak, aynı numunede genel primerler (989/990) ile yapılan PCR'da *Theileria*'nın varlığını gösteren pozitif amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. Bu durum, bölgede keçilerde ve muhtemelen koyunlarda *T. ovis* ve *T. lestoquardi*'den farklı bir tür ya da genotipin bulunabileceği şeklinde yorumlanabilir. Ancak, bunun açıklığa kavuşturulabilmesi için ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Türkiye'de koyun ve keçilerde bu güne kadar *Ixodidae* ailesine bağlı çok sayıda kene türü belirlenmiştir (13, 49, 63, 74, 80, 90). Elazığ yöresinde yapılan bir çalışmada, koyunların, *H. excavatum*, *H. detritum*, *H. marginatum*, *R. sangiuneus*, *R. bursa*, *Hae. otophila*, *Hae. sulcata*, *Hae. punctata*, *D. marginatus*, *Boophilus annulatus*, *O. lahorensis* türleri ile enfeste olduğu ve enfestasyon oranının %15-46 arasında değiştiği, en yüksek enfestasyonun yaz aylarında görüldüğü; keçilerde enfestasyon oranının % 10-45 arasında değiştiği ve koyunlarda tespit edilen *Hae. punctata*, *D. marginatus* ve *O. lahorensis* türlerinin keçilerde bulunamadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada koyunlar ve keçilerde en fazla *R. bursa*'ya rastlanmıştır (90). Malatya ve Bazı Güney Doğu Anadolu illerinde yapılan çalışmada, koyunların *B. annulatus*, *H. a. excavatum*, *H. a. anatolicum*, *H. detritum*, *Hae. parva*, *Hae. sulcata*, *Hae. punctata*, *R. bursa*, *R. sanguineus* ve *Ixodes ricinus* ile enfeste bulunduğu, ancak keçilerde bu türlerden *Hae. punctata*'ya rastlanmadığı, bunun yanında keçilerde *B. kohlsi*'nin belirlendiği bildirilmiştir (49). Güney Marmara bölgesinde yapılan çalışmada, koyunlarda *I. ricinus*, *B. annulatus*, *D. marginatus*, *H. a. anatolicum*, *H. a. excavatum*, *H. detritum*, *Hae. parva*, *Hae. numidiana*, *Hae. sulcata*, *Hae.*

punctata, *R. bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus* türleri tespit edilmiştir. Aynı çalışmada keçilerde, *I. ricinus*, *B. annulatus*, *D. marginatus*, *H. a. anatolicum*, *H. a. excavatum*, *H. detritum*, *Hae. parva*, *Hae. punctata*, *Hae. inermis*, *R. bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus* türlerine rastlanmıştır. Koyunların en fazla *R. bursa*, keçilerin ise *I. ricinus* ve *R. bursa* ile enfeste olduğu bildirilmiştir (13). Burdur yöresinde yapılan çalışmada, koyunlarda, *R. turanicus*, *R. bursa*, *Hae. parva*, *D. marginatus*, *D. niveus*'un erişkinleri ile *I. ricinus* ve *H. a. excavatum*, *Ornithodoros* sp. nimflerine; keçilerde, *R. turanicus*, *D. niveus*, *D. marginatus*, *Hae. parva*'nın erişkinleri ve *Rhipicephalus* spp. nimflerine rastlanmıştır. Aynı çalışmada *R. bursa*'nın koyunlar üzerinden toplanan kenelerin % 10,9'unu oluşturduğu, ancak bu kene türüne keçilerde rastlanmadığı bildirilmiştir (111). Kayseri yöresinde yapılan bir çalışmada, koyun ve keçilerde, *R. bursa*, *R. turanicus*, *R. sanguineus*, *D. niveus*, *H. marginatum*, *Hae. parva*, *Hae. sulcata*, *Hae. otophila* türlerine rastlanmıştır (55). Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yapılan bu çalışma esnasında Muş ve Malatya illerinde koyunlar üzerinde *R. bursa* ve *R. sanguineus* türleri tespit edilmiş, bu türlerin daha önce Türkiye'nin farklı yörelerinde yapılan çalışmalarda (13, 90) koyun ve keçilerde tespit edilen en yaygın türlerden olduğu ortaya çıkmıştır.

Yukarıdaki çalışmalardan koyun ve keçilerde yaygın olarak görülen türlerden birinin *R. bursa* olduğu anlaşılmaktadır (13, 90). *R. bursa*'nın *H. a. anatolicum* ile birlikte *T. ovis*'i deneysel olarak naklettiği bildirilmiştir (76, 102). Türkiye'de dalağı çıkarılarak parazitemi oranı % 0,02'den % 4'e yükseltile *T. ovis* ile enfekte bir koyun üzerinde beslenen *H. a. anatolicum* nimflerinin, gömlek değiştirmesi ile elde edilen aç erişkin kenelerin bazılarının tükürük bezlerinde

Theileria sporoblastlarının tespit edildiği bildirilmiştir (91). Yine Elazığ yöresinde yapılan bir çalışmada sahada koyunlar üzerinden toplanan *R. bursa*'da PCR ile *T. ovis* belirlenmiştir (3).

Gerek *R. bursa*'nın koyun ve keçilerde çok yaygın olarak bulunmuş olması ve gerekse doğal ve deneysel çalışmalarda *R. bursa*'da *Theileria* enfeksiyonunun belirlenmiş olması, bu kene türünün *T. ovis*'in yayılışında rol oynayabilecek muhtemel bir vektör olabileceği kanaatini doğurmaktadır. Ancak, bunun kesinlik kazanabilmesi için ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Sonuç olarak;

- Koyun ve keçilerde *T. ovis*'in teşhisine yönelik spesifik bir PCR metodu geliştirilmiş ve subklinik enfeksiyonların belirlenmesinde uygulanabilirliği ortaya konmuştur.
- Bu çalışmada tanımlanan primerler ile daha önce *T. lestoquardi* için tanımlanan primerlerin, her iki parazitin birlikte görüldüğü endemik bölgelerde türler arasındaki kesin ayırımın yapılmasında ve dolayısı ile koyun theileriosisi ile ilgili epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabileceği belirlenmiştir.
- Geliştirilen ve uygulanan moleküler metodun mikroskopik bakıya göre çok daha duyarlı ve özgül olduğu, *T. ovis*'ten kaynaklanan latent enfeksiyonların tespitinde kullanılması ile daha sağlıklı sonuçların elde edilebileceği görülmüştür.
- Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde koyun ve keçilerde *T. ovis*'in yaygın olarak bulunduğu ve subklinik enfeksiyonlara yol açtığı, çeşitli ülkelerde koyun ve keçilerde klinik enfeksiyonlara ve ölümlere neden olan, bazı çalışmalarda Türkiye'de de bulunduğu kaydedilen *T. lestoquardi*'nin bölgede bulunmadığı anlaşılmıştır.

- Bölgede özellikle keçilerde ve muhtemelen koyunlarda *T. ovis* dışında başka bir *Theileria* türünün veya *T. ovis*'e ait farklı bir genotipin bulunabileceği, ancak bunun aydınlığa kavuşturulabilmesi için genetik analizlere dayalı çalışmaların sürdürülmesi gerektiği kanatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Ahmed J, Yin H, Schnittger L, Jongejan F. (2002). Ticks and tick-borne diseases in Asia with special emphasis on China. *Parasitol Res* 88: 51-55.
2. Aktaş M, Altay K, Dumanlı N. (2005). Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of *Babesia ovis* infection in sheep and goats. *Vet Parasitol* 133: 277-281.
3. Aktaş M, Altay K, Dumanlı N. (2005). PCR-based detection of *Theileria ovis* in *Rhipicephalus bursa* adult ticks. (Veterinary Parasitology'ye gönderildi).
4. Aktaş M, Altay K, Dumanlı N, Tsuji MT, Kylie GB, Holman PJ. (2005). Variable polymorphism in ribosomal RNA intergenic spacers among ruminant *Theileria* species. (International Journal for Parasitology'ye gönderildi).
5. Aktaş M, Dumanlı N, Çetinkaya B, Çakmak A. (2002). Field evaluation of PCR in detecting *Theileria annulata* infection in cattle in the east of Turkey. *Vet Rec* 150: 548-549.
6. Aktaş M, Sevgili M, Dumanlı N, Karaer Z, Çakmak A. (2001). Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde tropikal theileriosisin seroprevalansı. *Turk J Vet Anim Sci* 25: 359-363.
7. Al-Amery MAY, Hasso SA. (2002). Laboratory diagnosis of novel species of *Theileria hirci*, *Eimeria caprovina* and *Eimeria pallida* in goats in Iraq. *Small Rum Res* 44: 163-166.
8. Alani AJ, Herbert IV. (1988). Pathogenesis of infection with *Theileria recondita* (Wales) isolated from *Haemaphysalis punctata* from North Wales. *Vet Parasitol* 4: 293-301.
9. Alani AJ, Konrad J, Herbert IV. (1987). Serodiagnosis of *Babesia motasi* (Wales), *Theileria recondita* (Wales) and *Cytoecetes phagocytophila* infection in sheep. *Res Vet Sci* 43 (1) : 104-108.
10. Allsopp BA, Baylis HA, Allsopp MT, Cavalier-Smith T, Bishop RP, Carrington DM, Sohanpal B, Spooner P. (1993). Discrimination between six species of *Theileria* using oligonucleotide probes which detect small subunit ribosomal RNA sequences. *Parasitology* 107: 157-165.
11. Almeria S, Castella J, Ferrer D, Ortuno A, Estrade-Pena A, Gutierrez JF. (2001). Bovine piroplasma in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Vet Parasitol* 99: 249-259.
12. Alyasino Y, Greiner M. (1999). Serosurvey on theileriosis in Awassi sheep in Syria. *Vet Parasitol* 81: 275-280.
13. Aydın L. (2002). Güney Marmara ruminantlarında görülen kene türleri ve yayılışları. *T Parazitol Dergisi* 24(2): 194-200.
14. Banerji PK, Samaddar J, Gupta R, Paul J, Guha C. (1990). Natural infection with *Theileria hicri* in jumnapary goat, a case report. *Ind J* 67(7): 677-678.

15. Basto AP, Portugal RS, Nix RJ, Cartaxeiro C, F, Boinas F, Dixon LK, Leitao A, Martins C. (2005). Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus*. Arch Virol. (baskıda).
16. Bauman R. (1939). Die kleinasiatische schafttheileriose. Berliner and Meunchener Tieraerztliche Wochenschrift 30: 469-474.
17. Bhattacharyulu SD, Dhar S, Gautam OP, Malik PD. (1973). Experimental transmission of theileriosis in sheep, a preliminary report. HAU J Res 2(3): 202-206.
18. Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. (2003). Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. J Clin Microbiol 41(9): 4172-4177.
19. Burridge MJ. (1971). Application of the indirect fluorescent antibody test in experimental East Coast fever (*Theileria parva* infection in cattle). Res in Vet Sci 12: 374-380.
20. Burridge MJ, Brown CG, Kimber CD. (1974). *Theileria annulata*: cross-reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. Exp Parasitol 35: 378-380.
21. Chae J-S, Allsopp BA, Waghela SD, Park JH, Kukuda T, Sugimoto C, Allsopp MTEP, Wagner GG, Holman PJ. (1999). A study of the systematics of *Theileria* spp. based upon small subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitol Res 85: 877-883.
22. Chang WL, Pan MJ. (1996). Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. J Clin Microbiol 34: 3142-3146.
23. Charyev O. (1992). Morphology and biology of Piroplasm in sheep and ticks. Izvestiya Akademi Nauk Turkmenistana Seriya Biology Cheskih Nauk 4: 78-80.
24. Clausen PH, Wiemann A, Patzelt R, Kakaire D, Pötzsch C, Peregrine A, Mehlitz D. (1999). Use of a PCR assay for the specific and sensitive detection of *Trypanosoma* spp. in naturally infected dairy cattle in peri-urban Kampala, Uganda. Ann NY Acad Sci 29: 21-31.
25. Costa JM, Pautas C, Ernault P, Foulet F, Cordonnier C, Bretagne S. (2000). Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. J Clin Microbiol 38: 2929-2932.
26. Çakmak A, Öz İ. (1993). Adana yöresi sığırlarında kan protozoonlarının serodiagnozu. AÜ Vet Fak Derg 40(1): 70-77.
27. Darghouth ME, Bouattour A, Ben Miled L, Sassi L. (1996). Diagnosis of *Theileria annulata* infection of cattle in Tunisia: comparison of serology and blood smears. Vet Res 27(6): 613-621.
28. d' Oliveira C, van der Weide M, Habela MA, Jacquiet P, Jongejan F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. J Clin Microbiol 33: 2665-2669.

29. Dumanlı N. (1987). *Theileria annulata*'nın sebep olduğu sığır theileriosisinin *Hyalomma excavatum* ile nakli üzerinde deneysel araştırmalar. Doğa-TU Vet ve Hay D 11(1): 14-20.
30. Dumanlı N, Aktaş M, etinkaya B, akmak A, Koroğlu E, şaki CE, Erdoğmuş Z, Nalbantoğlu S, Ongör H, şimşek S, Karahan M, Altay K. (2005). Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey. Vet Parasitol 127(1): 9-15.
31. Dumanlı N, Özer E. (1987). Elazığ yöresinde sığırlarda görölen kan parazitleri ve yayılışları üzerine araştırmalar. SÜ Vet Fak Derg 3(1): 159-166.
32. Du Toit JP. (1930). Theileriosis. Rept Sect Meeting. II. Intern Vet Congress 1-34. (eviren: Mimioğlu M. (1956). Türk Vet Hek Derg 116-117, 2952-2969).
33. Estrada-Pena A, Bouattour A, Camicas J-L, Walker AR. (2004). Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: a Guide to Identification of Species. Atalanta, Houten, The Netherlands.
34. Erkut HM. (1967). Ege bölgesi sığırlarında piroplasmosis durumu ve tedavide yeni ilaçlamalar. Bornova Vet Kont ve Araşt Enst Derg 8(16): 120-130.
35. Ferrer D, Castella J. (1999). Seroprevalence of *Theileria ovis* in small ruminants in north-east Spain determined by the indirect fluorescent antibody test. Vet Rec 145(12): 346-347.
36. Friedhoff K. (1997). Tick-borne disease of sheep and goats caused by *Babesia*, *Theileria* or *Anaplasma* spp. Parasitologia 39 (2): 99-109.
37. Gao YL, Yin H, Luo JX, Ouyang WQ, Bao HM, Guan GQ, Zhang QC, Lu WS, Ma ML. (2002). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Theileria* sp. infection in sheep. Parasitol Res 88: 8-10.
38. Gasser RB. (1999). PCR-based technology in veterinary parasitology. Vet Parasitol 84: 229–258.
39. Gasser RB, Monti JR. (1997). Identification of parasitic nematodes by PCR-SSCP of ITS-2 rDNA. Mol Cell Probes 11: 201–209.
40. Gill HS, Bhattacharyulu Y, Gill BS. (1980). Attempts to transmit *Theileria ovis* through the ticks *Haemaphysalis bispinosa* and *Rhipicephalus haemaphysalis*. Trop Anim Health Prod 12: 61.
41. Göksu K. (1959). Ankara ve yöresi sığırlarında theileriosis üzerinde sistemik araştırmalar. AÜ Vet Fak, Ankara.
42. Göksu K. (1967). Yerli Koyunlarımızda *Babesidae* ve *Theileridae*'nin Epizootiyolojik Durumlarıyla Biyolojilerine Dair Araştırmalar. (Epizootiological studies on *Theileria* spp. and *Babesia* spp. in local sheep). AÜ Vet Fak Yay No: 205.
43. Göksu K. (1985). Theileriosisin klinik semptomları ile ilgili gelişmeler. "Theileriosis" F Sayın (Editor). Türk Parasitol Dern Yay No: 5. Bilgehan Basımevi, İzmir. Sayfa: 97-109.
44. Gray MA, Luckins AG, Rae PF, Brown CGD. (1980). Evaluations of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of infections with *Theileria parva* and *T. annulata*. Res Vet Sci 29: 360-366.

45. Gubbels MJ, de Vos AP, van der Weide M, Viseras J, Schouls LM, de Vries E, Jongejan F. (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol* 37(6): 1782-1789.
46. Gubbels MJ, d'Oliveira C, Jongejan F. (2000). Development of an indirect Tams1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 7 (3): 404-411.
47. Gubbels MJ, Hong Y, van der Weide M, Oi B, Nijman IJ, Guangyuan L, Jongejan F. (2000). Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group. *Int J for Parasitol* 30: 943-952.
48. Guo S, Yuan Z, Wu G, Wang W, Ma D, Du H. (2002). Epidemiology of ovine theileriosis in Ganan region, Gansu Province, China. *Parasitol Res* 88: 36-37.
49. Güler S, Özer E, Erdoğan ŞZ, Köroğlu E, Bektaş İ. (1993). Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kene (*Ixodidae*) türleri. *Doğa-TU Vet ve Hay D* 17: 229-231.
50. Hashemi-Fersharki R. (1997). Tick-borne diseases of sheep and goats and their related vectors in Iran. *Parassitologia* 39(2): 115-117.
51. Hoffmann G, Horchner F, Schein E, Gerber E. (1971). Saisonales auftreten von zecken und piroplasmen bei haustieren in der asiatischen provinzen der Turkei. *Berl und Munch Tierarztl Wschr* 84: 152-156.
52. Hoosmand-Rad P, Hawa NJ. (1973). Malignant theileriosis of sheep and goats. *Trop Anim Health Prod* 5: 103-109.
53. Hoosmand-Rad P, Hawa NJ. (1973). Transmission of *Theileria hirci* in sheep by *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Trop Anim Health Prod* 5: 103-109.
54. İnci A, Çakmak A, Karaer Z, Atasever A, Dinçer Ş, Sayın F, İça A, Çam Y. (1999). Kayseri yöresinde tropikal theileriosisin epidemiyolojisi. 11. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Sivas.
55. İnci A, Nalbantoğlu S, Çam Y, Atasever A, Karaer Z, Çakmak A, Sayın F, Yukarı BA, İça A, Deniz A. (2003). Kayseri yöresinde koyun ve keçilerde theileriosis ve kene enfestasyonları. *Turk J Vet Anim Sci* 27: 57-60.
56. Jansen BC, Neitz WO. (1956). A discussion on the clasification of *Theileridae*. *J Ond Vet Res* 27: 7-18.
57. Jauregui LH, Higgins J, Zarlenga DS, Dubey JP, Lunney JK. (2001). Development of a real-time PCR assay for the detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *J Clin Microbiol* 39: 2065–2071.
58. Jenum PA, Holberg-Petersen M, Melby KK, Stray-Petersen B. (1998). Diagnosis of congenital *Toxoplasma gondii* infection by polymerase chain reaction (PCR) on amniotic fluid samples. *The Norwegian experience APMIS* 106(7): 680-686.
59. Karaer Z. (1985). Theileriosisin Bulaşması. "Theileriosis" F Sayın (Editor). *Türk Parasitol Dern Yay No: 5. Bilgehan Basımevi, İzmir. Sayfa: 47-76.*

60. Kawazu S, Kamio T, Kakuda T, Terada Y, Sugimoto C, Fujisaki K. (1999). Phylogenetic relationships of the benign *Theileria* species in cattle and Asian buffalo based on the major piroplasm surface protein (p33/34) gene sequences. *J Parasitol* 29(4): 613-618.
61. Kirvar E, Ilhan T, Katzer F, Wilkie G, Hooshmand-Rad P, Brown CGD. (1998). Detection of *Theileria lestoquardi (hirci)* in ticks, sheep, goats using polymerase chain reaction. *Ann NY Acad Sci* 849: 52-62.
62. Kirvar E, Ilhan T, Katzer F, Hooshmand-Rad P, Zweygarth E, Gerstenberg C, Phipps P, Brown CG. (2000). Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences. *Parasitology* 120: 245-254.
63. Kurtpınar H. (1954). Türkiye Keneleri. Güven Matbaası, Ankara.
64. Leemans I, Brown D, Hooshmand - Rad P, Kirvar E, Uggla A. (1999). Infectivity and cross-immunity studies of *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in sheep and cattle I. In vivo response. *Vet Parasitol* 82(3): 179-192.
65. Lestoquard F, Ekrem I. (1931). Les piroplasmoses du mouton en Turquie. *Bull Soc Pathol Exot* 2: 822-826.
66. Levine ND. (1973). Protozoon Parasites of Domestic Animals of Man. 2th Ed. Burgess Publish in House Minneapolis, U.S.A.
67. Levine ND. (1985). Veterinary Protozoology. Iowa State Uni. Ames, Iowa. Sayfa: 35-45.
68. Luo J, Yin H. (1997). Theileriosis in sheep and goats in China. *Trop Anim Health Prod* 29: 8-10.
69. Martin AR, Brown GK, Dunstan RH, Roberts TK. (2005). *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. *Exp Parasitol* 109: 176-180.
70. Mazyad SA, Khalaf SA. (2002). Studies on *Theileria* and *Babesia* infecting live and slaughtered animals in Al Arish and El Hasanah, North Sinai Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 32 (2) : 601-610.
71. Mehlhorn H. (2001). Encyclopedic Reference of Parasitology. Biyology, Structure, Function. Heidelberg: Springer, Berlin.
72. Mehlhorn H, Schein E. (1984). The Piroplasm: Life Cycle and Sexual Stages, "Advances in Parasitology" JR Baker ve R Muller (Editörler). Vol. 23. London. Sayfa: 37-103.
73. Mehlhorn H, Schein E, Warnecke M. (1979). 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* 26(3): 377-385.
74. Merdivenci A. (1969). Türkiye Keneleri Üzerine Araştırmalar. Kutulmuş Matbaası, İstanbul.
75. Nagore D, Garcia-Sanmartin J, Garcia-Perez AL, Juste RA, Hurdato A. (2004). Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in a sheep population from Northern Spain. *Int J Parasitol* 34 (9): 1059-1067.

76. Neitz WO. (1957). Theileriosis, Gondriosis and Cytauxozoonoses: A review. Onderstepoort J Vet Res 27: 275-430.
77. Norval RAI, Perry BD, Young AS. (1992). The Epidemiology of Theileriosis in Africa. Academic Pres, London.
78. Ogawa M, Setiyono A, Sato K, Cai Y, Shiga S, Kishimoto T. (2004). Evaluation of PCR and nested PCR assays currently used for detection of *Coxiella burnetii* in Japan. J Trop Med Public Health 35(4): 852-5.
79. Oura CAL, Bishop RP, Wampande EM, Lubega GW, Tait A. (2004). Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. Int J Parasitol 34: 603-613.
80. Oytun HŞ. (1947). Keneler, Zararları ve Savaş Çareleri. Y.Z.E. Basımevi, Ankara.
81. Özer E, Erdoğan SZ, Köroğlu E. (1993). Malatya ve Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kan parazitleri ve yayılışları. Doğa-TU Vet ve Hay D 17: 209-215.
82. Papadopoulos B, Brossard M, Perie NM. (1996). Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece. 3. Piroplasms of small ruminants. Vet Parasitol 63 (1-2): 67-74.
83. Pipano E. (1974). Immunological aspects of *Theileria annulata* infection. Bulletin off International Epizootiology 81: 139-159.
84. Razmi GR, Hosseini M, Aslani MR. (2003). Identification of tick vectors of ovine theileriosis in an endemic region of Iran. Vet Parasitol 116: 1-6.
85. Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira MM. (2005). Phylogeny of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. Parasitology (3): 1-10.
86. Salih DA, ElHussein AM, Hayat M, Taha KM. (2003). Survey of *Theileria lestoquardi* antibodies among Sudanese sheep. Vet Parasitol 111(4): 361-7.
87. Sanchez-Martin J, Viseras J, Adroher FJ, Garcia-Fernandez P. (1999). Nested polymerase chain reaction for detection of *Theileria annulata* and comparison with conventional diagnostic techniques: its use in epidemiology studies. Parasitol Res 85: 243-245.
88. Sayın F, Dinçer Ş, Dumanlı N, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H, Beyazıt A, Spooner RL, Brown CGD. (1994). Epidemiology of tropical theileriosis in Turkey. European Union Third Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, Antalya.
89. Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, Yukarı BA, Eren H, Değer S, Nalbantoğlu S. (1997). Status of the tick-borne diseases in sheep and goats in Turkey. Parasitologia 39 (2): 153-156.
90. Sayın F, Dumanlı N. (1982). Elazığ bölgesi evcil hayvanlarda görülen kene (*Ixodoidea*) türleri ile ilgili epizootiyolojik araştırmalar. AÜ Vet Fak Derg 29(2-3): 344-362.

91. Sayın F, Yukarı BA, Nalbantoğlu S, Deniz A, Duru O. (1999). Türkiye’de koyun ve keçilerde theileriosis epidemiyolojisi üzerine araştırmalar. Tübitak projesi son raporu. Proje no: VHAG-1339.
92. Schnittger L, Yin H, Gubbels MJ, Beyer D, Niemann S, Jongejan F, Ahmed JS. (2003). Phylogeny of sheep and goat *Theileria* and *Babesia* parasites. Parasitol Res 91 (5): 398-406.
93. Schnittger L, Yin H, Jianxun L, Lugwing W, Shayan P, Rahbari S, Voss-Holtmann A, Ahmed JS. (2000). Ribosomal small-subunit RNA gene-sequence analysis of *Theileria lestoquardi* and a *Theileria* species highly pathogenic for small ruminants in China. Parasitol Res 86 (2): 352-358.
94. Schrenzel MD, Maalouf GA, Gaffney PM, Tokarz D, Keener LL, McClure D, Griffey S, McAloose D, Rideout BA. (2005). Molecular characterization of isosporoid coccidia (*Isospora* and *Atoxoplasma* spp.) in passerine birds. J Parasitol 91(3): 635-647.
95. Sisodia RS, Gautam OP. (1983). Experimental cases of *Theileri hirci* infection in sheep and goats. Ind J Anim Sci 53: 162-166.
96. Sisodia RS, Mandial RK. (1987). Management of clinical cases of theileriosis in field in cattle and sheep with special reference to current concept of therapy. Prevention and Control Veterinary 1(1): 7-11.
97. Soulsby E.J.L. (1986). Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Bailliere Tindall, London.
98. Sparagano OA, Allsopp MT, Mank RA, Rijpkema SG, Figueroa JV, Jongejan F. (1999). Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: *Ixodidae*): a review. Exp App Acar Sci 23: 929-960.
99. Tageldin MH, Zahia AM, Nagma ZG, El Savi SAS. (1992). An outbreak of theileriosis in sheep in Sudan. Trop Anim Health Prod 24: 15-16.
100. Taylor LH, Katzer F, Shiels BR, Welburn SC. (2003). Genetic and phenotypic analysis of Tunisian *Theileria annulata* clones. Parasitology 126(3): 241-252.
101. Tomkins LS. (1992). The use of molecular methods in infectious disease. N Eng J Med 327(18): 1290-1297.
102. Uilenberg G. (1981). Theilerial Species of Domestic Livestock. “Advances in the Control of Theileriosis” AD Irvin, Cunningham MP ve Young AS (Editörler). Martinus Nijhoff Publishers.
103. Uilenberg G, Schreuder BEC. (1976). Studies on *Theileridae* (sporozoa) in Tanzania. Tick transmission of *Haematoxenus veliferus*. Tropenmedizin und Parasitologie 25: 207-216.
104. Vashishta MS, Mathur PD. (1987). Observation on a fatal outbreak of theileriosis in goats. Ind J Anim Health 26(1): 78.
105. Vashishta MS, Mathur PD, Goswami SK. (1987). Fatal goat theileriosis in India. Ind J Anim Health 26(1): 61-62.

106. Vatanserver Z, Nalbantoğlu S. (2002). Detection of cattle infected with *Theileria annulata* in fields by nested PCR, IFAT and microscopic examination of blood smears. Turk J Vet Anim Sci 26: 1465-1469.
107. Vatanserver Z, İa A, Deniz A, Nalbantoğlu S, Karaer Z, akmak A, Sparagano O. (2003). Ankara Yöresinde kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının reverse line blotting (RLB) ve indirek floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması. XIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi. Konya.
108. Wang FX, Li O, Li W, Wang WX, Hua D, Wang LZ, Guo RM, Shi WZ, Li ZM. (1980). Investigation on theileriosis hirci in Huangyuan, Menyuan and Jianzha counties (in Chinese). Newsl Vet Med Anim Husb (Qinghai) 3: 29-32.
109. Yin H, Luo J, Schnittger L, Lu B, Beyer D, Ma M, Guan G, Bai Q, Lu C, Ahmed J. (2004). Phylogenetic analysis of *Theileria* species transmitted by *Haemaphysalis qinghaiensis*. Parasitol Res 92(1): 36-42.
110. Yin H, Zhang QC, Lu WX, Dou HF, Yu F, Lu ES. (1996). Studies on complement fixation test for diagnosis of *Theileria annulata*. Clin J Vet Sci Tech 26: 9-11.
111. Yukarı BA, Umr Ş. (2002). Burdur yöresinde sığır, koyun ve keçilerde kene (*Ixodoidae*) türlerinin yayılışı. Turk J Vet Anim Sci 26: 1263-1270.
112. Zarlenga DS, Chute MB, Martin A, Kapel CMO. (1999). A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. Int J Parasitol 29(11): 1859-1867.
113. Zarlenga DS, Chute MB, Gasbarre LC, Boyd PC. (2001). A multiplex PCR assay for differentiating economically important gastrointestinal nematodes of cattle. Vet Parasitol 97: 199-209.
114. Zarlenga DS, Higgins J. (2001). PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. Vet parasitol 101: 215-230.
115. Zhou BS, Wu JH, Zhang GH, Qi LS, Xu ZF, Pu DQ, Wang SG. (1980). *Theileria* (in Chinese). Newsl Vet Anim Husb Sci (Qinghai) 3: 33-37.

8. ÖZGEÇMİŞ

01.06.1979 tarihinde Gümüşhane'nin Kelkit ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Kelkit'te tamamladım. 1996 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesine girdim ve 2001 yılında Veteriner Hekim ünvanıyla mezun oldum. 2001-2002 Güz döneminde Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açmış olduğu sınavı kazanarak, Parazitoloji Anabilim Dalında doktora başladım. 2002 yılında Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen Parazitoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.