

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**KÖPEKLERDE BABESIOSIS, HEPATOOONOSIS,
ANAPLASMOSIS, EHRLICHIOSIS, NEOSPOROSIS VE
TOXOPLASMOSIS'İN REAL TIME PCR İLE ARAŞTIRILMASI**

Proje No: TSA-11-3439

Proje Türü
Normal Araştırma Projesi (NAP)

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Abdullah İNCİ
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Öğr.Gör. Zuhall ÖNDER
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Nisan 2013

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Araştırmacılar, bu çalışmaya TSA-11-3439 kod numaralı proje ile maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, ayrıca kullanılan materyalin temini açısından “Kayseri ve Yöresi Köpeklerinde Filaria Enfeksiyonlarının ELISA ve Membran Filtrasyon Asit Fosfataz Histo Kimyasal Boyama Yöntemleri ile Araştırılması” başlıklı ve VA-05-04 kodlu, “Kayseri ve Civarında Köpeklerde Leishmaniosis'in Nested-PCR ile Moleküler Biyolojik Tanısı” başlıklı ve 104O302 kodlu araştırma projeleriyle destek sağlayan ERU Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi ve TÜBİTAK'a teşekkür ederler. Ayrıca araştırmacılar çalışmada kullanılan referans izolatları gönderen Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia Enstitüsü/ Palermo, İtalya'da Dr. Alessandra Torina'ya; Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalından Yrd. Doç. Dr. Nuran Selek AYSUL'a; Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Münir AKTAŞ'a ve Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan Dr. Cahit BABÜR'e desteklerinden dolayı teşekkür ederler.

KÖPEKLERDE BABESIOSIS, HEPATOOZONOSIS, ANAPLASMOSIS, EHRLICHIOSIS, NEOSPOROSIS VE TOXOPLASMOSIS'İN REAL TIME PCR İLE ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışma, daha önce yürütülmüş projeler kapsamında Kayseri'nin çeşitli bölgelerindeki köpeklerden toplanmış toplam 400 adet EDTA'lı kan örneğinde vector-borne (*Babesia canis vogeli*, *B. canis canis*, *B. canis rossi*, *B. gibsoni*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*) ve food-borne (*Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*) protozoon türlerinin araştırılması amacıyla planlanmıştır. Kan örneklerinden genomik DNA izolasyonunu takiben, elde edilen genomik DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri yapılmış ve Real Time PCR (qPCR) için uygun konsantrasyonlar hazırlanmıştır. *B. canis vogeli* ve *B. canis canis* için hsp70, *B. canis rossi* ve *H. canis* için 18S rRNA, *B. gibsoni* için TRAP, *E. canis* için 16S rRNA, *N. caninum* için NC5, *T. gondii* RE ve *A. phagocytophilum* için msp2 gen bölgelerini hedef alan spesifik primer ve probalar kullanılarak örneklerin qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. qPCR sonuçlarına göre *E. canis* %14,5 ile en yaygın tür belirlenmiş olup bunu sırasıyla %12,0, %9,0, %7,8, %5,3, %3,8 ve %2,3 ile *B. canis canis*, *B. gibsoni*, *A. phagocytophilum*, *H. canis*, *N. caninum* ve *B. canis vogeli* takip etmiştir. İncelenen örneklerde *B. canis rossi* ve *T. gondii*'ye rastlanmamıştır. Pozitif belirlenen örneklerin 197'si (%90,4) tek türle enfekte bulunurken, 21'i (%9,6) iki türle miks enfekte saptanmıştır. İki türle miks enfeksiyonlarda; *B. gibsoni* + *B. canis canis* 12 örnekte, *H. canis* + *B. canis canis* 4 örnekte, *A. phagocytophilum* + *H. canis* 3 örnekte; *E. canis* + *B. gibsoni* ise 2 örnekte saptanmıştır. Real Time PCR analizlerinde pozitif belirlenen *B. canis canis* için 3, *B. canis vogeli* için 2, *B. gibsoni* için de 3 izolatın 18S rRNA geni yönünden sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. *B. canis canis*, *B. canis vogeli* ve *B. gibsoni* izolatlarının pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında ve dünyadan alignmenta dahil edilen aynı türden diğer izolatlarla aralarında sırasıyla ortalama $1,4 \pm 0,2$, $0,3 \pm 0,2$ ve $0,9 \pm 0,3$ farklılık saptanmıştır. *E. canis* için 16S rRNA gen bölgesi yönünden sekans analizi yapılan üç izolatın pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında %100 identik oldukları, dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında ise ortalama %0,1 oranında farklılık bulunduğu, *A. phagocytophilum* için ankA gen bölgesi yönünden sekans analizi yapılan üç izolatın pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında $99,8 \pm 0,2$ identik oldukları, dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında ise ortalama $0,9 \pm 0,3$ farklılık olduğu ve *H. canis* için 18S rRNA geni yönünden sekans analizi yapılan iki izolatın ise pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında %100

identik oldukları, dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında ise ortalama $0,2 \pm 0,1$ farklılık bulunduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Kayseri yöresinde köpeklerde görülen vector-borne ve food-borne protozoon enfeksiyonlarının moleküler prevalansları ortaya konmuştur. Ayrıca enfeksiyona yol açan türlerin çeşitli gen bölgeleri analiz edilerek moleküler karakterizasyonları yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Köpek, babesiosis, hepatozoonosis, anaplasmosis, ehrlichiosis, neosporosis, toxoplasmosis, Real Time PCR

INVESTIGATION OF BABESIOSIS, HEPATOZOONOSIS, ANAPLASMOSIS, EHRLICHIOSIS, NEOSPOROSIS AND TOXOPLASMOSIS IN DOGS BY REAL TIME PCR

ABSTRACT

This study was designed to investigate vector-borne (*Babesia canis vogeli*, *B. canis canis*, *B. canis rossi*, *B. gibsoni*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*) and food-borne (*Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*) protozoan species in total of 400 dog blood samples with EDTA which were collected from the dogs in different parts of Kayseri region as part of the previously performed projects. Following the isolation of genomic DNA from the blood samples, spectrophotometric measurements of the obtained genomic DNAs were performed and appropriate concentrations were prepared for Real Time PCR (qPCR). qPCR analyses of the samples were conducted using the specific primers and probes that target the gene regions hsp70 for *B. canis vogeli* and *B. canis canis*, 18S rRNA for *B. canis rossi* and *H. canis*, TRAP for *B. gibsoni*, 16S rRNA for *E. canis*, NC5 for *N. caninum*, RE for *T. gondii*, and msp2 for *A. phagocytophilum*. According to the results of qPCR, *E. canis* was detected as the most prevalent species with 14.5%, and *B. canis canis*, *B. gibsoni*, *A. phagocytophilum*, *H. canis*, *N. caninum* and *B. canis vogeli* followed this with 12.0%, 9.0%, 7.8%, 5.3%, 3.8% and 2.3%, respectively. *B. canis rossi* and *T. gondii* were not detected in the examined samples. Of the positive samples, 197 (90.4%) were found infected with a single species, and 21 (9.6%) were determined infected with two species. In the mix infections with two species; *B. gibsoni* + *B. canis canis* in 12 samples, *H. canis* + *B. canis canis* in 4 samples, *A. phagocytophilum* + *H. canis* in 3 samples, and *E. canis* + *B. gibsoni* in 2 samples were determined. Sequence analyses of 3 isolates for *B. canis canis*, 2 for *B. canis vogeli*, and 3 for *B. gibsoni* which were found as positive in Real Time PCR assays were performed with respect 18S rRNA gene region. According to the pairwise comparisons of *B. canis canis*, *B. canis vogeli* and *B. gibsoni*, average $1.4 \pm 0.2\%$, $0.3 \pm 0.2\%$, and $0.9 \pm 0.3\%$ genetic distance were detected with each other, and with other isolates from same species in the world, respectively. According to the pairwise comparisons, it was detected that 100% identity between each other and average 0.1% genetic difference with the other isolates from the world for 3 isolates for *E. canis* with respect to 16S rRNA gene region; $99.8 \pm 0.2\%$ identity between each other and average $0.9 \pm 0.3\%$ genetic difference with the other isolates from the world for 3 isolates for *A. phagocytophilum* with respect to ankA gene region; and

100% identity between each other and average 0.2 ± 0.1 % genetic difference with the other isolates from the world for 2 isolates for *H. canis* with respect to 18S rRNA gene region.

In conclusion, the molecular prevalence of vector-borne and food-borne protozoan infections in dogs in Kayseri region was exhibited in this study. In addition, the molecular characterizations of the species which cause the infections were performed analyzing the various gene regions.

Key Words: Dog, babesiosis, hepatozoonosis, anaplasmosis, ehrlichiosis, neosporosis, toxoplasmosis, Real Time PCR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
KAPAK	1
TEŞEKKÜR	3
ÖZET	4
ABSTRACT	6
İÇİNDEKİLER	8
TABLO LİSTESİ	10
ŞEKİL LİSTESİ	12
1. GİRİŞ/ AMAÇ VE KAPSAM	15
2. GENEL BİLGİLER	16
2.1. BABESIOSIS	16
2.2. HEPATOZOONOSİS	17
2.3. ANAPLASMOSİS VE EHRLİCHİOSİS	18
2.4. NEOSPOROSİS	18
2.5. TOXOPLASMOSİS	19
2.6. KÖPEKLERDE KENELERLE BULAŞAN (TICK-BORNE) VE GIDAYLA BULAŞAN (FOOD-BORNE) PROTOZOON ENFEKSİYONLARININ TEŞHİSİ	20
2.7. KÖPEKLERDE TICK-BORNE VE FOOD-BORNE PROTOZOON ENFEKSİYONLAR ÜZERİNE TÜRKİYE’DE YAPILAN ÇALIŞMALAR	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. HAYVAN MATERYALİ (KÖPEKLER) VE KAN ÖRNEKLERİ	23
3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI	23
3.2.1. DNA Ekstraksiyonu	23
3.2.2. Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)	24
3.2.3. Sekans ve Filogenetik Analizler	26
3.2.3.1. <i>Babesia</i> türlerinin 18S rRNA Geninin Amplifikasyonu, Sekansı ve Filogenetik Analizi	26
3.2.3.2. <i>Ehrlichia canis</i> ’in 16S rRNA Geninin Amplifikasyonu, Sekansı ve Filogenetik Analizi	27
3.2.3.3. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> ’un ankryin (ankA) Geninin Amplifikasyonu, Sekansı ve Filogenetik Analizi	28
3.2.3.4. <i>Hepatozoon canis</i> ’in 18S rRNA Geninin Amplifikasyonu, Sekansı ve Filogenetik Analizi	28
3.2.3.5. <i>Neospora caninum</i> ’un Internal Transcribe Spacer 1 (ITS1) Geninin Amplifikasyonu	29
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	30
4. BULGULAR	31
4.1. REAL TIME PCR SONUÇLARI VE PROTOZOON ENFEKSİYONLARININ PREVALANSI	31
4.2. VECTOR-BORNE VE FOOD-BORNE PROTOZOON ENFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER PREVALANSINDA BAZI EPİDEMİYOLOJİK FAKTÖRLERİN ANALİZİ	39
4.3. SEKANS VE FİLOGENETİK ANALİZ SONUÇLARI	43
4.3.1. <i>Babesia</i> türlerinin 18S rRNA Geninin Sekans ve Filogenetik Analiz Sonuçları	44
4.3.2. <i>Ehrlichia canis</i> ’in 16S rRNA Geninin Sekans ve Filogenetik Analiz	55

Sonuçları	
4.3.3. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 'un Ankryin (ankA) Geninin Sekans ve Filogenetik Analiz Sonuçları	63
4.3.4. <i>Hepatozoon canis</i> 'in 18S rRNA Geninin Sekans ve Filogenetik Analiz Sonuçları	68
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	73
6. KAYNAKLAR	83

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1. Kan örneklerinin toplama merkezi, yaş, cinsiyet, ırk, ve sahipli/sokak köpeği olma durumuna göre dağılımları	23
Tablo 3.2. Real Time PCR’da kullanılan tür spesifik primer ve işaretli problemler	25
Tablo 4.1. İncelenen köpeklerde vector-borne ve food-borne protozoon enfeksiyonları yönünden pozitif belirlenen örneklerin araştırma merkezlerine göre dağılımı	32
Tablo 4.2. <i>B. canis canis</i> prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özellikleriyle ilişkisi	40
Tablo 4.3. <i>B. canis vogeli</i> prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özellikleriyle ilişkisi	40
Tablo 4.4. <i>B. gibsoni</i> prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özellikleriyle ilişkisi	41
Tablo 4.5. <i>E. canis</i> prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özellikleriyle ilişkisi	41
Tablo 4.6. <i>A. phagocytophilum</i> prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özellikleriyle ilişkisi	42
Tablo 4.7. <i>H. canis</i> prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özellikleriyle ilişkisi	42
Tablo 4.8. <i>N. caninum</i> prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özellikleriyle ilişkisi	43
Tablo 4.9. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen <i>Babesia</i> izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler	44
Tablo 4.10. Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer <i>Babesia</i> izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler	47
Tablo 4.11. <i>Babesia</i> türleri yönünden multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları	48
Tablo 4.12. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen <i>Ehrlichia</i> izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler	55
Tablo 4.13. Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer <i>Ehrlichia</i> izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler	58
Tablo 4.14. <i>E. canis</i> yönünden multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları	59
Tablo 4.15. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen <i>Anaplasma</i> izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler	63
Tablo 4.16. Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer <i>Anaplasma</i> izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler	65
Tablo 4.17. <i>A. phagocytophilum</i> yönünden multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları	65
Tablo 4.18. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen <i>Hepatozoon</i> izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler	68

Tablo 4.19. Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer <i>Hepatozoon</i> izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler	69
Tablo 4.20. <i>H. canis</i> yönünden multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları	70

ŞEKİL LİSTESİ

	SayfaNo
Şekil 4.1. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu <i>B. canis canis</i> pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri	33
Şekil 4.2. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu <i>B. canis vogeli</i> pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri	33
Şekil 4.3. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu <i>B. gibsoni</i> pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri	34
Şekil 4.4. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu <i>E. canis</i> pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri	34
Şekil 4.5. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu <i>A. phagocytophilum</i> pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri	35
Şekil 4.6. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu <i>H. canis</i> pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri	35
Şekil 4.7. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu <i>N. caninum</i> pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri	36
Şekil 4.8. <i>T. gondii</i> için TaqMan Real Time PCR analiz sonuçları	36
Şekil 4.9. <i>B. rossi</i> için TaqMan Real Time PCR analiz sonuçları	37
Şekil 4.10. Real Time PCR’da <i>B. canis canis</i> pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı	37
Şekil 4.11. Real Time PCR’da <i>B. canis vogeli</i> pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı	37
Şekil 4.12. Real Time PCR’da <i>B. gibsoni</i> pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı	38
Şekil 4.13. Real Time PCR’da <i>E. canis</i> pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı	38
Şekil 4.14. Real Time PCR’da <i>A. phagocytophilum</i> pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı	38
Şekil 4.15. Real Time PCR’da <i>H. canis</i> pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı	39
Şekil 4.16. Real Time PCR’da <i>N.caninum</i> pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı	39
Şekil 4.17. <i>B. canis canis</i> TrKysBccan1 izolatının nükleotid dizilimi	44
Şekil 4.18. <i>B. canis canis</i> TrKysBccan2 izolatının nükleotid dizilimi	45
Şekil 4.19. <i>B. canis canis</i> TrKysBccan3 izolatının nükleotid dizilimi	45
Şekil 4.20. <i>B. canis vogeli</i> TrKysBcvog1 izolatının nükleotid dizilimi	45
Şekil 4.21. <i>B. canis vogeli</i> TrKysBcvog2 izolatının nükleotid dizilimi	46
Şekil 4.22. <i>B. gibsoni</i> TrKysBgib1 izolatının nükleotid dizilimi	46
Şekil 4.23. <i>B. gibsoni</i> TrKysBgib2 izolatının nükleotid dizilimi	46
Şekil 4.24. <i>B. gibsoni</i> TrKysBgib3 izolatının nükleotid dizilimi	47
Şekil 4.25. <i>Babesia</i> izolatlarının ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların 18S rRNA gen dizilimlerinin pairwise analizleri	49
Şekil 4.26. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen <i>Babesia</i> izolatları ile Dünyadaki diğer bazı <i>Babesia</i> izolatlarının parsiyel 18S rRNA gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları	53
Şekil 4.27. Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan <i>Babesia</i> izolatları ile GenBank’a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların 18S rRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları	54

Şekil 4.28. <i>E. canis</i> TrKysEcan1 izolatının nükleotid dizilimi	56
Şekil 4.29 <i>E. canis</i> TrKysEcan2 izolatının nükleotid dizilimi	57
Şekil 4.30. <i>E. canis</i> TrKysEcan3 izolatının nükleotid dizilimi	58
Şekil 4.31. <i>E. canis</i> izolatlarının ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların 16S rRNA gen dizilimlerinin pairwise analizleri	59
Şekil 4.32. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen <i>E. canis</i> izolatları ile Dünyadaki diğer bazı <i>E. canis</i> izolatlarının parsiyel 16S rRNA gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları	62
Şekil 4.33. Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan <i>E. canis</i> izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların 16S rRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları	63
Şekil 4.34. <i>A. phagocytophilum</i> TrKysAp1 izolatının nükleotid ve amino asit dizilimleri	64
Şekil 4.35 <i>A. phagocytophilum</i> TrKysAp2 izolatının nükleotid ve amino asit dizilimleri	64
Şekil 4.36. <i>A. phagocytophilum</i> TrKysAp3 izolatının nükleotid ve amino asit dizilimleri	64
Şekil 4.37. <i>A. phagocytophilum</i> izolatlarının ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların ankA gen dizilimlerinin pairwise analizleri	66
Şekil 4.38. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen <i>A. phagocytophilum</i> izolatları ile Dünyadaki diğer bazı <i>A. phagocytophilum</i> izolatlarının parsiyel ankA gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları	67
Şekil 4.39. Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan <i>A. phagocytophilum</i> izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların ankA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları	68
Şekil 4.40. <i>H. canis</i> TrKysHcan1 izolatının nükleotid dizilimi	69
Şekil 4.41. <i>H. canis</i> TrKysHcan2 izolatının nükleotid dizilimi	69
Şekil 4.42. <i>H. canis</i> izolatlarının ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların 18S rRNA gen dizilimlerinin pairwise analizleri	70
Şekil 4.43. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen <i>H. canis</i> izolatları ile Dünyadaki diğer bazı <i>H. canis</i> izolatlarının parsiyel 18S rRNA gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları	71
Şekil 4.44. Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan <i>H. canis</i> izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların ankA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları	72

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Köpeklerde; kenelerle bulaşan (tick-borne) *Babesia*, *Hepatozoon*, *Anaplasma*, *Ehrlichia* soylarında patojen çeşitli tür, alt tür ya da genotiplerinin oluşturduğu enfeksiyonların yanında *Neospora caninum* ve *Toxoplasma gondii* gibi vertikal yol ve/veya karnivorizmle (food-borne) bulaşan enfeksiyonlar da görülmektedir. Bunlardan babesiosis, hepatozoonosis, anaplasmosis ve ehrlichiosis’de klinik tablo, şiddetli seyreder ve tedavi edilmeyen vakalarda genellikle ölüm görülür. Buna karşılık neosporosis ve toxoplasmosis ise genellikle subklinik veya latent seyir gösterir ve ölüm nadiren görülür. Bu patojenlerden bazıları (*Anaplasma phagocytophilum*, *Toxoplasma gondii*) aynı zamanda zoonotik karakterde olup halk sağlığı açısından da önemlidirler.

Türkiye’de köpeklerde babesiosis, hepatozoonosis, anaplasmosis, ehrlichiosis, neosporosis ve toxoplasmosis’in varlığı, etiyolojisi ve moleküler epidemiyolojileri ile ilgili henüz yeteri bilgi bulunmamaktadır. Türkiye’nin hayvancılık profili son yıllarda değişiklik göstermiş ve pet hayvan sayısında önemli bir artış olmuştur. İnsana en yakın çiftlik ve aynı zamanda bir pet hayvanı olan köpeklerde vektör-borne ve food-borne patojenlerin varlığı ve yaygınlıklarının bilinmesi ve buna göre gerekli tedavi, kontrol ve korunma tedbirlerinin alınıp uygulanabilmesi için söz konusu etkenlerin moleküler epizootiolojilerinin ortaya konması gerekmektedir.

Bu çalışmada, Kayseri yöresinde sahipli ve sokak köpeklerinden daha önce temin edilmiş ve Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı cryobankında (-80 °C) muhafaza edilen toplam 400 adet kan örneği; *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*, *B. gibsoni*, *Hepatozoon canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Neospora caninum* ve *Toxoplasma gondii*’nin varlığı yönünden Real Time PCR yöntemi ile moleküler olarak incelenmiştir. Bulunan pozitif örneklerin çeşitli ribozomal ve nükleer gen bölgelerinin sekans analizleri ile GenBank kayıtları ve moleküler filogenetik analizleri yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Vektör-borne patojenler, tüm dünyada yaygın olarak bulunmakta olup evcil ve yabani hayvanlarda klinik ve subklinik enfeksiyonlar oluşturarak ölüm ve verim kaybına neden olmaktadır (1). Bunlardan babesiosis, hepatozoonosis, anaplasmosis ve ehrlichiosis köpek enfeksiyözleri içerisinde önemli bir yere sahiptir (2). Diğer yandan uluslararası turizm ve seyahat aktivitelerinin dünya çapında artması ve yaygınlaşması ‘‘emerging infectious diseases’’ olarak ifade edilen ve köpeklerde vector-borne kaynaklı enfeksiyonlar üzerindeki ilgiyi artırmıştır. Buna bağlı olarak, son yıllarda köpeklerde bu hastalıkların moleküler epizootiolojileri ile ilgili önemli bilgilerin elde edildiği ve bir çok yeni etkenin tanımlandığı görülmektedir (3, 4, 5).

2.1. BABESIOSIS

Köpek babesiosis‘i, nabız artışı, depresyon, solunum güçlüğü, ateş, anemi, hemoglobinuri, trombositopeni, sarılık ve organlarda fonksiyon bozuklukları ile karakterize önemli bir tick-borne enfeksiyondur (2, 4, 6). Klasik anlamda *Babesia* türlerinin ayrımı, eritrositik formlarının morfolojik özellikleri dikkate alınarak yapılır ve 3-5 µm arasındakiler büyük, 1,5-2,5 µm arasında olanlar ise küçük türler olarak sınıflandırılır (4, 7). Buna göre köpeklerdeki parazitler, büyük *Babesia* türlerini içeren *Babesia canis* grubu (*B. canis canis*, *B. canis rossi*, *B. canis vogeli*) ve küçük *Babesia* türlerini içeren *Babesia gibsoni* grubu (*B. gibsoni*, *B. conradae*) olmak üzere ikiye ayrılır (4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14). Bu türlerin coğrafik dağılımı, antijenik özellikleri, vektör kene spesifitesi ve moleküler filogenik özelliklerinde farklılıklar görülmektedir. Büyük türler, çoğunlukla Güney Afrika’nın da içinde yer aldığı geniş bir coğrafyada görülürken, küçük türler, Güney Asya, Kuzey Afrika, İspanya ve ABD’de görülmektedir (9, 10, 11, 12). İlk defa Hindistan’da tanımlanan ve Asya için endemik bir tür olarak kabul edilen *B. gibsoni*’ye, son yıllarda Avrupa, Ortadoğu, Afrika, Avustralya ve Kuzey Amerika’da da sporadik vakalar şeklinde rastlanmaktadır (2, 12, 15). Bu bölgelerde sporadik *B. gibsoni* vakalarının görülmesi, insanların beraberinde pet hayvanları ile seyahat etmeleri ile ilişkilendirilmiştir (2). *B. gibsoni*, *Rhipicephalus sanguineus* ve *Haemaphysalis* spp. ile nakledilmektedir (2). *B. gibsoni*’ye göre daha geniş bir alana yayılmış olan *B. canis canis*, ılıman iklim kuşağında yer alan ülkelerde (16, 17, 18), *B. canis rossi* Güney Afrika’da (19), kozmopolit bir tür olan *B. canis vogeli* ise *Rhipicephalus sanguineus*’un bulunduğu bölgelerde görülmektedir (20). Büyük türler, *Dermacentor*

reticulatus, *R. sanguineus* ve *Haemaphysalis leachi* ile nakledilirler (2). Son yıllarda köpeklerde *B. canis* ve *B. gibsoni* dışında, klinik infeksiyonlara yol açan büyük ve küçük yapıda yeni türler tarif edilmiştir. Kuzey Carolina’da, morfolojik yapı itibari ile *B. canis*’e, genetik olarak *B. caballi* ve *B. bigemina*’ya benzeyen ve *Babesia* sp. Coco olarak isimlendirilen yeni bir tür, yada genotipin varlığı rapor edilmiştir (14). Yine Güney Kaliforniya’da morfolojik olarak *B. gibsoni*’ye benzeyen, ancak genetik olarak *B. gibsoni*’den farklı ve *B. gibsoni*’ye göre daha patojen olan ve henüz isimlendirilmemiş yeni küçük piroplasmik parazitin varlığı ortaya konmuştur (4). Filogenetik olarak *B. microti*’ye benzeyen ve *Theileria annae* olarak adlandırılan bu parazitin, Kuzey Amerika ile birlikte İspanya, Portekiz gibi bazı Avrupa ülkelerinde de yaygın olarak bulunduğu rapor edilmiştir (17, 21, 22).

Köpeklerde babesiosis’e yol açan bu türlerin gerek patojenitelerinin ve gerekse anti-babesial ilaçlara karşı verilen cevaplarının farklı olmasından dolayı, herhangi bir ülke yada bölgede enfeksiyona neden olan piroplasmik parazitin moleküler karakterizasyonunun bilinmesi, hastalığa karşı alınacak korunma, kontrol ve özellikle tedavi stratejilerinin ortaya konması için önemlidir (23, 24).

2.2. HEPATOZOONOSIS

Hepatozoon türlerine memeliler, sürüngenler ve kuşlarda rastlanmaktadır. Bu soya bağlı 300’den fazla tür tanımlanmıştır. Bu türlerden 46’sının memelilerde, 120’sinin sürüngenlerde parazitlendiği bilinmektedir. Bunlardan *Hepatozoon americanum* ve *H. canis*’in köpeklerde klinik enfeksiyonlar oluşturması önemlidir (25, 26, 27). Klinik olarak köpek hepatozooniosisinde düzensiz ya da devam eden ateş, mukopurulent gözyaşı akıntısı, yürüyüş bozukluğu, şiddetli kas ağrısı, vücutta katılık, kilo kaybı, anemi, uyuşukluk ve paraliz görülür (26, 27). Bulaşma, köpeklerin *Hepatozoon* ookistlerini taşıyan keneleri yemeleri ile gerçekleşir. Biyolojik döngüde gametogoni ve sporogoni safhası kenelerin sindirim sisteminde, aseksüel safha (merogoni) köpeklerin iç organ endotel hücreleri, karaciğer parankim hücreleri ve iskelet kası hücrelerinde gerçekleşir (25, 28, 29). *H. americanum*’un vektörü *Amblyomma maculatum*’dur. *H. canis* için primer vektör *R. sanguineus* olmakla birlikte diğer ixodid kenelerin de vektör olabileceği bildirilmiştir (30, 31). *H. canis* için köpekler, vektör kene *R. sanguineus*’un her üç gelişme (larva, nimf, erişkin) dönemini tercihen köpeklerden kan emerek tamamlamasından dolayı en uygun rezervuar konak olarak

kabul edilmektedir (32). *H. canis* Güney Avrupa, Asya, Orta Doğu ve Güney Amerika başta olmak üzere geniş bir coğrafyada görülürken, *H. americanum*'a sadece Kuzey Amerika'da rastlanmıştır (27, 33). Daha önceleri Kuzey Amerika'da bulunmadığı kabul edilen *H. canis*, son yapılan bir araştırmada 30 köpekte tespit edilmiştir. Bu köpeklerin aynı zamanda *H. americanum* ile de enfekte oldukları bildirilmiştir (34, 35).

2.3. ANAPLASMOSİS VE EHRLİCHİOSİS

Keneler ile nakledilen riketsial patojenler, dünyanın bütün kıtalarında görülür ve memeli hayvanlarda klinik ve subklinik enfeksiyonlara yol açarlar (36). Köpeklerde bu dizi içinde yer alan *Anaplasma* soyuna bağlı *A. phagocytophilum* ve *A. platys*, *Ehrlichia* soyuna bağlı ise *Ehrlichia canis*, *E. chaffaensis* ve *E. ewingii* türleri bulunmaktadır (37, 38). *Anaplasma* ve *Ehrlichia* türlerinden kaynaklanan enfeksiyonlarda trombositopeni, yüksek ateş, depresyon, kilo kaybı, solunum güçlüğü, letarji, kusma, yürümede isteksizlik, lenfadenopati ve splenomegali en sık rastlanan klinik bulgulardır. Enfeksiyon, konağın immun sisteminin durumu, organizmanın türü ve suşuna bağlı olarak akut, subklinik veya kronik bir seyir gösterir (39, 40). *E. canis* ve *E. chaffaensis* mononükleer, *A. phagocytophilum* ve *E. ewingii* granülositik lökositleri, *A. platys* ise trombositleri enfekte eder (39). *Anaplasma* ve *Ehrlichia* türlerinin coğrafik yaygınlığını, vektör kenelerin dağılımı belirler. Dünyanın hemen her bölgesinde yaygın olarak bulunan ve köpeklerde yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden enfeksiyonlara neden olan *E. canis*, tabii şartlarda *R. sanguineus* ile nakledilmektedir. Ancak bu parazit, bazı *Dermacentor* türleri ile de deneysel olarak nakledilebilmiştir (39, 41, 42). Sadece ABD'de tespit edilen ve aynı zamanda zoonotik karaktere sahip *E. chaffaensis* ile *E. ewingii*, *A. americanum* ile nakledilmektedir (39). Anaplasmosis'e yol açan türler çeşitli arthropod türleri ile nakledilirler (43). Sığır koyun, keçi, at gibi evcil hayvanlarda da yaygın görülen ve zoonotik karakterli olan *A. phagocytophilum*, *Ixodes* türleri ile nakledilir (44, 45). Köpeklerde *A. phagocytophilum* enfeksiyonlarının dağılımının insan vakalarının coğrafik dağılımı ile paralellik gösterdiği ileri sürülmüştür (46).

2.4. NEOSPOROSİS

İlk defa 1984 yılında ensefalit ve miyozitli köpeklerde teşhis edilen *Neospora caninum*, dokularda kist oluşturan protozoonlardan birisidir. Heteroksen gelişme gösterir. Parazitin bilinen kesin konakları köpek ve çakallar; ara konakları ise sığır, koyun, keçi, at ve geyiklerdir. Köpekler aynı zamanda ara konak ödevi de görebilmektedir. *N. caninum*'un

yaşam döngüsünde takizoit, bradizoit ve sporozoit olmak üzere üç enfektif safha vardır. Bulaşma oral (horizontal) veya vertikal (transplasental) yolla olur. *N. caninum*, *Toxoplasma gondii* ile çok benzerlik gösteren bir parazittir. Morfolojik olarak birbirlerinden ayırt edilemezler. Ancak genetik ve antijenik yapıları farklıdır (47, 48, 49). *N. caninum* birçok hücre tipini enfekte eder. Ancak enfeksiyonun erken döneminde özellikle mononükleer fagositik sistem hücrelerine yerleşir. Takizoit formu, parazitofor vakuol içinde endodyogeni yoluyla hızlı bir biçimde ikiye bölünerek çoğalır, enfekte hücrenin parçalanması ile takizoitler yeni hücrelere girerler. Bu sırada takizoitler, daha yavaş bölünme özelliğine sahip olan bradizoit formuna dönüşürler. Daha sonra parazitofor vakuolün duvarı kalınlaşmaya başlar ve sonunda inaktif bradizoitleri içeren bir kist duvarı şekillenir. Sinir ve kas dokularında bulunan bu kistler köpekler için enfektiftir. Doku kistlerinin duvar kalınlığı toksoplazmozda 1 µm'den az, Neosporosis'te 4 µm kadardır. Bradizoitler bazı hallerde tekrar takizoit formuna dönüşebilirler *N. caninum*, konaklarında abortusa neden olur. Gebe bir hayvanın enfekte olması neticesinde fetal abortus şekillenebileceği gibi klinik olarak sağlıklı ancak latent enfekte hayvanlar da doğabilir (48, 49, 50, 51).

2.5. TOXOPLASMOSİS

Toxoplasma gondii; Apicomplexa anaç bölümünde yer alan zorunlu hücre içi bir protozoon parazittir. Parazitin seksüel ve aseksüel olmak üzere iki evreli hayat siklusu vardır. Seksüel gelişme, kesin konak kedilerin barsak epitel hücrelerinde meydana gelir. Bu evrenin sonunda 10-12 µm çapındaki ookistler dışkı ile tabiata atılırlar. Bunlar enfektif olmayan, olgunlaşmamış ookistlerdir. Ookistler tabiatta sporulasyon safhasını tamamladıktan sonra ara konaklar (kedi dahil tüm memeliler ve kanatlılar) ve kesin konak için enfektif olurlar. *T. gondii*'nin seksüel evresi konağa spesifiktir. Parazitin kedigillerden başka bilinen kesin konağı yoktur. Ara konak spektrumu ise çok geniştir. İnsan dahil bir çok omurgalı arakonak vazifesi görür. *T. gondii*'nin takizoit, bradizoit ve sporozoit olmak üzere 3 enfektif formu vardır (52). Toxoplasmosis'in ara konaklara bulaşması; doku kisti içeren hayvan etlerinin çiğ veya az pişmiş olarak tüketilmesiyle; enfekte kedilerin dışkısı ile atılan ve tabiatta sporlanan ookistlerin bulaştığı yiyecek ve içeceklerin ağız yoluyla alınmasıyla; parazitemi döneminde tüm vücut salgıları, kan ve doku nakilleri ile ve gebelik döneminde şekillenen akut enfeksiyon durumunda fetusa plasenta aracılığı ile olmaktadır (52, 53). Ara konakda bağırsak epitel hücrelerinin enfekte olmasından sonra, sporozoit veya bradizoitler, takizoitlere dönüşerek,

hücre içi parazitofor vakuol içinde endodyogeni yoluyla hızlı bir şekilde çoğalırlar. Enfekte hücre takizoitlerle tamamen dolduğu zaman, plazma membranı parçalanır ve takizoitler ekstrasellüler ortama yayılır. Serbest takizoitler hemen hemen karşılaştıkları bütün çekirdekli hücreleri enfekte edebilir ve hücre içi çoğalma devam ederler. Takizoitlerin hücreleri invaze etmeleri sonucunda doku hasarı şekillenir. Takizoit üretmesi immün kompetan hayvanlarda immün sistem tarafından kontrol edilir. Parazitik uyarımın ardından immün cevabın oluşmasıyla, takizoitlerin aktivitesi azalır ve membranla kaplanmış kistler içinde bradizoit formunda toplanırlar. İmmünitenin gelişmesinden sonra takizoit formu konak dokularından temizlenir ve esasen parazitin uyusuk veya zararsız formu olarak adlandırılan bradizoitler yavaş bir biçimde çoğalmaya başlarlar. Kistler içinde yaşayan bradizoitler, konağın immün sisteminden kist duvarı sayesinde korunurlar. Böylece, pasif halde konakçı vücudunda yıllarca canlı kalabilir. Bradizoitler hem ara konak hem de son konaklar için enfektiftir.

2.6. KÖPEKLERDE KENELERLE BULAŞAN (TICK-BORNE) VE GIDAYLA BULAŞAN (FOOD-BORNE) PROTOZoon ENFEKSİYONLARININ TEŞHİSİ

Babesiosis, hepatozoonosis, anaplasmosis ve ehrlichiosis gibi keneler ile nakledilen hastalıkların kontrolünde yapılacak çalışmalar, büyük ölçüde hastalığa neden olan tür, alt tür ve genotipin spesifik yöntemlerle identifiye edilerek moleküler karakterizasyonlarının yapılmasına bağlıdır. Portörlerin belirlenmesinde uzun yıllar serolojik teşhis metotlarından yararlanılmıştır. Ancak türler arasında çapraz reaksiyonların görülebilmesi, serolojik test sonuçlarını tartışılır hale getirmiştir (54). Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmelerle birlikte, hastalık etkenlerinin DNA'sını belirleme prensibi ile çalışan metotlar ortaya çıkmış ve günümüzde hastalık etkenlerinin moleküler teşhisinde vazgeçilmez birer araç olmuştur. Son yıllarda köpeklerde çeşitli protozoon parazitleri teşhisinde spesifitesi oldukça yüksek olan ve kantitasyona olanak sağlayan Real Time PCR tekniği kullanılmaya başlamıştır (5, 55, 56, 57, 58).

2.7. KÖPEKLERDE TICK-BORNE VE FOOD-BORNE PROTOZoon ENFEKSİYONLAR ÜZERİNE TÜRKİYE'DE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Türkiye'de köpeklerde tick-borne enfeksiyonların moleküler epidemiyolojileri ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Köpeklerde ilk klinik babesiosis vakası 1935 yılında bildirilmiştir

(59). Daha sonra 1961 yılında Ankara’da bir, 2003 yılında Aydın’da iki, 2005 yılında aynı ilde 7 köpekte enfeksiyon tanımlanmıştır (60, 61, 62). Moleküler yöntemler ile Ege bölgesinde 383 köpeğin 40’ında, İstanbul ilinde bir araştırmada 3, başka bir araştırmada ise 483 köpeğin 19’unda *B. canis vogeli* tespit edilmiştir (63, 64, 65).

Köpeklerde hepatozoonosis ile ilgili ilk vaka Tüzdil (66) tarafından 1933’de, ikinci vaka ise 2004 yılında Aydın’da rapor edilmiştir (67). Takiben Ege bölgesinde 6 farklı odakta köpeklerde *Hepatozoon canis*’ten kaynaklanan enfeksiyonlar bildirilmiştir (68). Diğer yandan IFAT ve dot-ELISA ile yapılan serolojik araştırmalarda, %67,8’e varan oranlarda anti *E. canis* antikoru tespit edilmiştir (69, 70). İstanbul’da bir köpekte klinik, hematolojik ve serolojik bir anaplasmosis vakası bildirilmiştir (71). *E. canis*’in Türkiye’de ilk kez moleküler tespiti ve karakterizasyonu Unver ve ark. (72) tarafından yapılmıştır. Bir köpekte *Anaplasma platys*’in moleküler düzeyde varlığı bildirilmiştir (73). Ege bölgesinde köpek barınaklarında yürütülen moleküler bir araştırmada, 371 köpeğin 146’sında *A. platys*, 154’ünde *E. canis*, 193’ünde *A. phagocytophila* tespit edilmiştir (74). Doğal enfeksiyonlar çoğunlukla mikss karakterli olup birden birden fazla patojen tabloya iştirak edebilmektedir. Nitekim Ege bölgesinde yapılan bir araştırmada, *H. canis* ile doğal enfekte 10 köpeğin 8’inde aynı zamanda *E. canis*, *A. platys* ve *A. phagocytophilum* enfeksiyonları da tespit edilmiştir (75). Elazığ yöresinde insan ve hayvanlardan toplanan keneler örneklerinde PCR ile %2,47 oranında *Anaplasma* ve *Ehrlichia* türleri yönünden pozitiflik belirlenmiştir. Sekans analizi sonucunda bu örneklerin *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp. ve *Anaplasma ovis* olduğu tespit edilmiştir (76). Diğer yandan Doğu Karadeniz yöresinden insanlardan toplanan kene örneklerinde moleküler olarak %11,6 oranında *A. phagocytophilum* pozitifliği tespit edilmiştir (77).

Diğer yandan köpeklerde toxoplasmosis ve neosporosis gibi food-borne enfeksiyonlar son yıllarda moleküler yöntemlerle araştırılmıştır (57, 58). Türkiye’de ise bu güne kadar köpeklerde bu iki enfeksiyonun moleküler yöntemlerle araştırılmasına dair veriye rastlanılmamıştır. Bununla beraber Türkiye’de yapılan bazı serolojik çalışmalarda köpeklerde *T. gondii* seropozitifliği Bursa Gemlik Askeri Harası’nda %68,5 (78), Kayseri yöresinde %49,5 (79), Kocaeli’nde %69,8 (80), Şanlıurfa’da %97,5 (81), İstanbul’da %51,3 (82), Sivas’ta %92,0 (83), Ankara’da %54,0 (84), Kars’ta 96,1 (85), Diyarbakır’da %94,0 (86) ve Doğu Anadolu’da %97,0 (87) pozitiflik saptanmıştır. Neosporosis üzerine köpeklerde yapılan serolojik çalışmalar daha sınırlı olup Batmaz ve ark., (88) Bursa’da bir köpekte klinik

neosporosis olgusu tarif etmişler, Kırıkkale’de ise Yıldız ve ark., (89) *N. caninum*’un seropozitifliğini %28,9 olarak rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada köpeklerdeki tick-borne (babesiosis, hepatozoonosis, anaplasmosis, ehrlichiosis) ve food-borne (neosporosis ve toxoplasmosis) protozoon enfeksiyonları diğer teşhis yöntemlerine göre sensitivite ve spesifitesi daha yüksek olan Real Time PCR ile moleküler olarak araştırılmıştır. Ayrıca, pozitif belirlenen örneklerde izolatların sekans analizleri yapılarak hem konfirmasyonları sağlanmıştır. Elde edilen izolatların filogenetik analizleriyle moleküler karakterizasyonları yapılmış ve dünyadaki diğer izolatlarla yakınlık dereceleri araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HAYVAN MATERYALİ (KÖPEKLER) VE KAN ÖRNEKLERİ

Çalışmanın materyalini, ERU Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından desteklenen “Kayseri ve Yöresi Köpeklerinde *Filaria* Enfeksiyonlarının ELISA ve Membran Filtrasyon Asit Fosfataz Histo Kimyasal Boyama Yöntemleri ile Araştırılması” başlıklı ve VA-05-04 kodlu ve TÜBİTAK tarafından desteklenen “Kayseri ve Civarında Köpeklerde Leishmaniosis'in Nested-PCR ile Moleküler Biyolojik Tanısı” başlıklı ve 104O302 kodlu araştırma projeleri kapsamında Kayseri'nin çeşitli bölgelerindeki köpeklerden toplanmış ve Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Cryo-Bankında (-20°C) muhafaza edilen toplam 400 adet EDTA'lı (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate) kan örneği oluşturmuştur. Araştırmaya dahil edilen örneklerin örnek toplama merkezi, yaş, cinsiyet, ırk, ve sahipli/sokak köpeği olma durumuna göre dağılımları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kan örneklerinin toplama merkezi, yaş, cinsiyet, ırk, ve sahipli/sokak köpeği olma durumuna göre dağılımları

Araştırma Merkezi	Köpek sayısı									
	Yaş (yıl)			Cinsiyet		İrk		Sahipli/Sokak		TOPLAM
	0,5-3	4-6	7-10	Erkek	Dişi	Küçük	Büyük	Sahipli	Sokak	
Kayseri Merkez	152	37	11	63	137	79	121	151	49	200
İncesu	31	12	6	20	29	22	27	26	23	49
Pınarbaşı	16	6	4	7	19	9	17	19	7	26
Felahiye	15	7	3	9	16	9	16	14	11	25
Talas	30	13	3	15	31	17	29	34	12	46
Tomarza	14	9	1	7	17	10	14	14	10	24
Yahyalı	12	16	2	8	22	10	20	19	11	30
TOPLAM	270	100	30	129	271	156	244	277	123	400

3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI

3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Köpek kanlarından DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır. Analize tabi tutulana kadar -20°C'de muhafaza edilen EDTA'lı kan örnekleri ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözünmeye bırakılmıştır. Çözünen örneklerden DNA ekstraksiyonu, tam otomatik DNA/RNA ekstraksiyon cihazında (Bioneer Exiprep™ 16) yapılmıştır. Final elüsyon 50µl olacak şekilde ayarlanmış ve elde edilen DNA miktarları Nanodrop spektrofotometre (ACT

Gene ASP-3700) kullanılarak ölçülmüştür. Genomik DNA ekstraktları kullanılabilmek için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Elde edilen genomik DNA ekstraktlarında *Babesia*, *Hepatozoon*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neospora* ve *Toxoplasma* cinslerine bağlı türlerin gerçek zamanlı teşhisinde Real Time PCR yöntemi kullanılmıştır. Türler için kullanılan primer ve probın dizilimi ile probın uçlarının işaretleri Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Kullanılan primer ve prob, *B. canis vogeli* ve *B. canis canis* için heat shock protein 70 (hsp70), *B. canis rossii* ve *H. canis* için 18S rRNA, *B. gibsoni* için thrombospondin-related adhesive protein (TRAP), *E. canis* için 16S rRNA, *N. caninum* için NC5, *T. gondii* için 529-bp repeat element (RE) ve *A. phagocytophilum* için msp2 gen bölgelerini hedef alan spesifik bölgeleri amplifiye etmektedir.

B. gibsoni ve *E. canis* için kontrol DNA izolatları Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndan (Yrd. Doç. Dr. Nuran Selek AYSUL), *A. phagocytophilum*, *B. canis canis* ve *B. gibsoni* kontrol DNA izolatları Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia Enstitüsü/ Palermo, İtalya'dan (Dr. Alessandra Torina), *H. canis* kontrol DNA izolatları Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndan (Prof. Dr. Münir AKTAŞ); *T. gondii* Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan (Dr. Cahit BABÜR) temin edilmiş ve her qPCR reaksiyonunda kullanılmıştır. *N. caninum* için ayrıca Path-N.caninum - genesig real-time PCR detection kit (PrimerDesign) ile örnekler analiz edilmiş, kit içerisinde bulunan pozitif kontrol analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Real Time PCR’da kullanılan tür spesifik primer ve işaretli probalar

	Primer	Prob	Kaynak
B. canis vogeli	HSP70 F 5'- GTCATCACTGTGCCTGCGTACT-3'	HSP70 P 5' FAM- AGCGCCAGGCCACCAAGG ACGCT-3'-BHQ1	Peleg ve ark., 2010
	HSP70 R 5'- GCATGACGTTGAGACCGGCAAT-3'		
B. canis canis	HSP70 F 5'- ACGCCAACGGTATCTTGAAC -3'	HSP70 P 5' HEX- ATCACCAACGACAAGGGTC GTCTCA -BHQ1	(orijinal dizayn)
	HSP70 R 5'- CAACCATACGCTCAATGTCTG -3'		
B. canis rossi	18S F 5'-AGGTCGTCGTTTGTGTTGACC-3'	18 S P 5'CY3- ATCAAAGTCTTTGGGTTCC TGGGGG-3'-BHQ2	(orijinal dizayn)
	18S R 5'- TTTCAGCCTTGCGACCATAC -3'		
B. gibsoni	TRAP F 5'- TGTACCCAAACCACGACAGA -3'	TRAP P ROX 5'- ROX- GTGAGTGACAGTGCAGTGG C-3' BHQ2	(orijinal dizayn)
	TRAP R 5'- TCTTTCCCCAATGTCCAGAG - 3'		
E. canis	16S F 5'- TCGCTATTAGATGAGCCTACGT- 3'	16S P 5' FAM- GTCTGAGAGGACGATCAGC CACACT-3'- BHQ1	Peleg ve ark., 2010
	16S R 5' GAGTCTGGACCGTATCTCAGT-3'		
H. canis	18S F 5'- CGCGAAATTACCCAATT-3'	18S P HEX 5'- TATCAATTGGAGGGCAAGT CTGGTGC-3'- BHQ1	Criado-Fornelio ve ark., 2007
	18S R 5'- CAGACCGTTACTTTTYAGCAG- 3'		
N. caninum	NC5-550 5'- GGGTGAACCGAGGGAGTTG- 3'	NC5 P ROX- AGCGGTGAGAGGTGGGAT ACGTGG- BHQ2	Ghalmi ve ark., 2008
	NC5-596: 5'- ACGTGAGGAATGACTAACCACAA-3'		
T. gondii	ToxoRE_F 5'- CACAGAAGGGACAGAAGTCGAA-3'	ToxoRE P FAM-5'- CTACAGACGCGATGCC-3'- BHQ1	Kasper ve ark., 2009
	ToxoRE_R 5'- CAGTCCTGATATCTCTCCTCCAAGA-3'		
A. phagocytophilum	ApMSP2 F 5'- ATGGAAGGTAGTGTGTTATGGTATT- 3'	ApMSP2 P HEX (5'- TGGTGCCAGGGTTGAGCTT GAGATTG- 3' BHQ1	Courtney ve ark., 2004
	ApMSP2 R 5'- TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA-3'		

Primer ve probalar QPCR Master Mixleri ile aşağıdaki oranda hazırlandıktan sonra örneklerden ekstrakte edilmiş genomik DNA’lar ilave edilmiş ve final master mix 20µl hacimde Real Time PCR (Stratagene, Mx-3005P) cihazında işlenmiştir. Sonuçlar MxPro™ ET QPCR (Stratagene, 401467) yazılımında değerlendirilmiştir.

Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies)	10,0 µl
Primer 1 (10 pmol)	1,0 µl
Primer 2 (10 pmol)	1,0 µl
Primer 3 (10 pmol)	1,0 µl
Primer 4 (10 pmol)	1,0 µl
Genomik DNA (50 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	3,0 µl

Real Time PCR amplifikasyonları için termal profil standart olarak 95 °C 2dk 1 siklus ve 45 siklus 94 °C 10sn, 55-59 °C 30s, 72 °C 20s olarak ayarlanmıştır. Real Time PCR analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler ve kantitatif değerler, amplifikasyon eğrileri ve Ct (dR) (Eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

3.2.3. Sekans ve Filogenetik Analizler

3.2.3.1. *Babesia* türlerinin 18S rRNA Geninin Amplifikasyonu, Sekansı ve Filogenetik Analizi

Real Time PCR analizleri sonucunda *Babesia* türleri yönünden pozitif belirlenen izolatların analizi için 18S rRNA gen bölgesinden 490 bp parsiyel kısmı amplifiye eden Bab7 (5'-GGC TAC CAC ATC TAA GGA AG-3') ve Bab9 (5'-CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA G-3') primerleri ile PCR analizleri gerçekleştirilmiştir (Duarte ve ark., 2011). Reaksiyon karışımı 25µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 1 X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 10 pmol her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 1,25U Taq DNA polymerase ve 50 ng/µl template DNA olarak hazırlanmıştır (Duarte ve ark., 2011).

Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 94 °C'de 2 dk; 35 siklus, denaturation: 94 °C'de 30s, annealing: 56 °C'de 30s, extension: 72 °C'de 30sn; final extension: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (Duarte ve ark., 2011). PCR analizlerinde pozitif referans kontrollerin herhangi bir kontaminasyonun meydana gelip gelmediğini belirlemek amacı ile steril deiyonize su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

PCR sonucu jel üzerinde uygun konsantrasyonda belirlenen ampikonlar, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonrası örnekler 18S-rRNA parsiyel gen bölgesinin analizi için Bab7 ve Bab9 primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlara ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999) ve Geneious (Drummond ve ark., 2011) yazılımları ile forward ve revers dizilimlerin pairwise alignmentları yapılmış final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra Dünyada GenBank'a kayıtlı diğer benzer izolatlar ile Mega 5.0 (Tamura ve ark., 2011) ve Geneious 6 (Drummond

ve ark., 2011) yazılımlarında multiple alignmentları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur.

3.2.3.2. *Ehrlichia canis*'in 16S rRNA Geninin Amplifikasyonu, Sekansı ve Filogenetik Analizi

Real Time PCR analizleri sonucunda *E. canis* yönünden pozitif belirlenen izolatların analizi için 16S rRNA gen bölgesinden ~1600 bp parsiyel kısmı amplifiye eden EC16-F2 (5'-GGTAGTCCACGCTGTAAACGA-3') ve EC16-R2 (5'-GGAGTGCTTAACGCGTTAGCT-3') primerleri ile PCR analizleri gerçekleştirilmiştir (Hsieh ve ark., 2010). Reaksiyon karışımı 25µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 1 X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,8 µM her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 0,125U Taq DNA polymerase ve 50 ng/µl template DNA olarak hazırlanmıştır (Duarte ve ark., 2011).

Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 94 °C'de 3 dk; 35 siklus, denaturation: 94 °C'de 1 dk, annealing: 55 °C'de 1 dk, extension: 72 °C'de 1,5 dk; final extension: 72 °C'de 5 dk olacak şekilde programlanmıştır (Duarte ve ark., 2011). PCR analizlerinde pozitif referans kontrollerin herhangi bir kontaminasyonun meydana gelip gelmediğini belirlemek amacı ile steril deiyonize su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

PCR sonucu jel üzerinde uygun konsantrasyonda belirlenen amplikonlar, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonrası örnekler 18S-rRNA parsiyel gen bölgesinin analizi için EC16-F2 ve EC16-R2 primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlara ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999) ve Geneious (Drummond ve ark., 2011) yazılımları ile forward ve revers dizilimlerin pairwise alignmentları yapılmış final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra Dünyada GenBank'a kayıtlı diğer benzer izolatlar ile Mega 5.0 (Tamura ve ark., 2011) ve Geneious 6 (Drummond ve ark., 2011) yazılımlarında multiple alignmentları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur.

3.2.3.3. *Anaplasma phagocytophilum*'ün ankryin (ankA) Geninin Amplifikasyonu, Sekansı ve Filogenetik Analizi

Real Time PCR analizleri sonucunda *E. canis* yönünden pozitif belirlenen izolatların analizi için ankA gen bölgesinden 444 bp parsiyel kısmı amplifiye eden LA6 (5'-GAGAGATGCTTATGGTAAGAC-3') ve LA1 (5'-CGTTCAGCCATCATTGTGAC-3') primerleri ile PCR analizleri gerçekleştirilmiştir (Walls ve ark., 2000). Reaksiyon karışımı 25µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 1 X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 10 µM her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 1,25U Taq DNA polymerase ve 50 ng/µl template DNA olarak hazırlanmıştır (Walls ve ark., 2000).

Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 94 °C'de 3 dk; 35 siklus, denaturation: 94 °C'de 30 sn, annealing: 54 °C'de 30sn, extension: 72 °C'de 1 dk; final extension: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (Walls ve ark., 2000). PCR analizlerinde pozitif referans kontrollerin herhangi bir kontaminasyonun meydana gelip gelmediğini belirlemek amacı ile steril deiyonize su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

PCR sonucu jel üzerinde uygun konsantrasyonda belirlenen ampikonlar, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonrası örnekler 18S-rRNA parsiyel gen bölgesinin analizi için LA6 ve LA1 primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlara ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999) ve Geneious (Drummond ve ark., 2011) yazılımları ile forward ve revers dizilimlerin pairwise alignmentları yapılmış final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra Dünyada GenBank'a kayıtlı diğer benzer izolatlar ile Mega 5.0 (Tamura ve ark., 2011) ve Geneious 6 (Drummond ve ark., 2011) yazılımlarında multiple alignmentları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur.

3.2.3.4. *Hepatozoon canis*'in 18S rRNA Geninin Amplifikasyonu, Sekansı ve Filogenetik Analizi

Real Time PCR analizleri sonucunda *H. canis* yönünden pozitif belirlenen izolatların analizi için 18S rRNA gen bölgesinden 666 bp parsiyel kısmı amplifiye eden HepF (5'-

ATACATGAGCAAAAATCTCAAC-3') ve HepR (5'-CTTATTATTCCATGCTGCAG-3') primerleri ile PCR analizleri gerçekleştirilmiştir (Inokuma ve ark., 2002). Reaksiyon karışımı 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 1 X PCR buffer, 1 mM MgCl₂, 1 µM her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 1,5U Taq DNA polymerase ve 50 ng/µl template DNA olarak hazırlanmıştır (Vargas-Hernandez ve ark., 2012).

Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 94 °C'de 3 dk; 53 siklus, denaturation: 94 °C'de 1 dk, annealing: 57 °C'de 2 dk, extension: 72 °C'de 2 dk; final extension: 72 °C'de 7 dk olacak şekilde programlanmıştır (Vargas-Hernandez ve ark., 2012). PCR analizlerinde pozitif referans kontrollerin herhangi bir kontaminasyonun meydana gelip gelmediğini belirlemek amacı ile steril deiyonize su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

PCR sonucu jel üzerinde uygun konsantrasyonda belirlenen ampikonlar, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonrası örnekler 18S-rRNA parsiyel gen bölgesinin analizi için HepF ve HepR primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlar ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999) ve Geneious (Drummond ve ark., 2011) yazılımları ile forward ve revers dizilimlerin pairwise alignmentları yapılmış final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra Dünyada GenBank'a kayıtlı diğer benzer izolatlar ile Mega 5.0 (Tamura ve ark., 2011) ve Geneious 6 (Drummond ve ark., 2011) yazılımlarında multiple alignmentları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur.

3.2.3.5. *Neospora caninum*'un Internal Transcribe Spacer 1 (ITS1) Geninin Amplifikasyonu

Real Time PCR analizleri sonucunda *N. caninum* yönünden pozitif belirlenen izolatların analizi için ITS1 gen bölgesinden 400 bp parsiyel kısmı amplifiye eden birinci PCR'da JS4 (5'-CGAAATGGGAAGTTTTGTGAAC-3') ve CT2b (5'-TTGCGCGAGC CAAGACATC-3') primerleri ile; ikinci PCR'da ise CT1 (5'-TGAATCCCAAGCAAAACA-3') ve CT2 (5'-GCGCGAGCCAAGACATCCAT-3') primerleri ile Nested PCR analizleri gerçekleştirilmiştir (Slapeta ve ark., 2002; Monteiro ve ark., 2007). Reaksiyon karışımı 25 µl final

konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı her iki PCR reaksiyonu için de; 1 X PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 10 µM her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 1,5U Taq DNA polymerase ve birinci reaksiyonda 50 ng/µl template DNA ikinci reaksiyonda ise ilk amplikondan 1µl olarak hazırlanmıştır (Silva ve ark., 2009).

Thermalcyclerda protokol her iki PCR için initial denaturation: 94 °C’de 5 dk; 40 siklus, denaturation: 94 °C’de 1 dk, annealing: 60 °C’(1. PCR), 55 °C’(2. PCR) de 1 dk, extension: 72 °C’de 1 dk; final extension: 72 °C’de 7 dk olacak şekilde programlanmıştır (Silva ve ark., 2009). PCR analizlerinde pozitif referans kontrollerin herhangi bir kontaminasyonun meydana gelip gelmediğini belirlemek amacı ile steril deiyonize su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 ’luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistik açıdan incelenen köpeklerde vector-borne ve food-borne protozoon enfeksiyonlarının prevalansı ile yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma faktörlerinin ilişkisi, Fisher’s Exact ve Pearson’s Chi Square testleriyle araştırılmıştır.

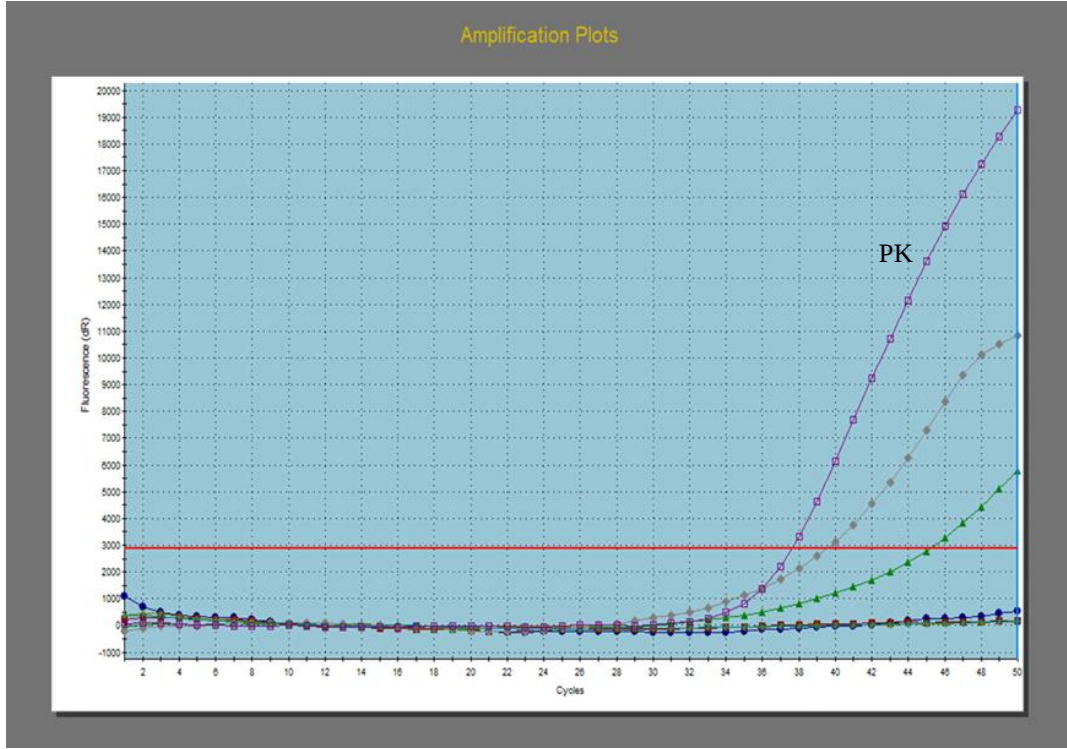
4. BULGULAR

4.1. REAL TIME PCR SONUÇLARI VE PROTOZoon ENFEKSİYONLARININ PREVALANSI

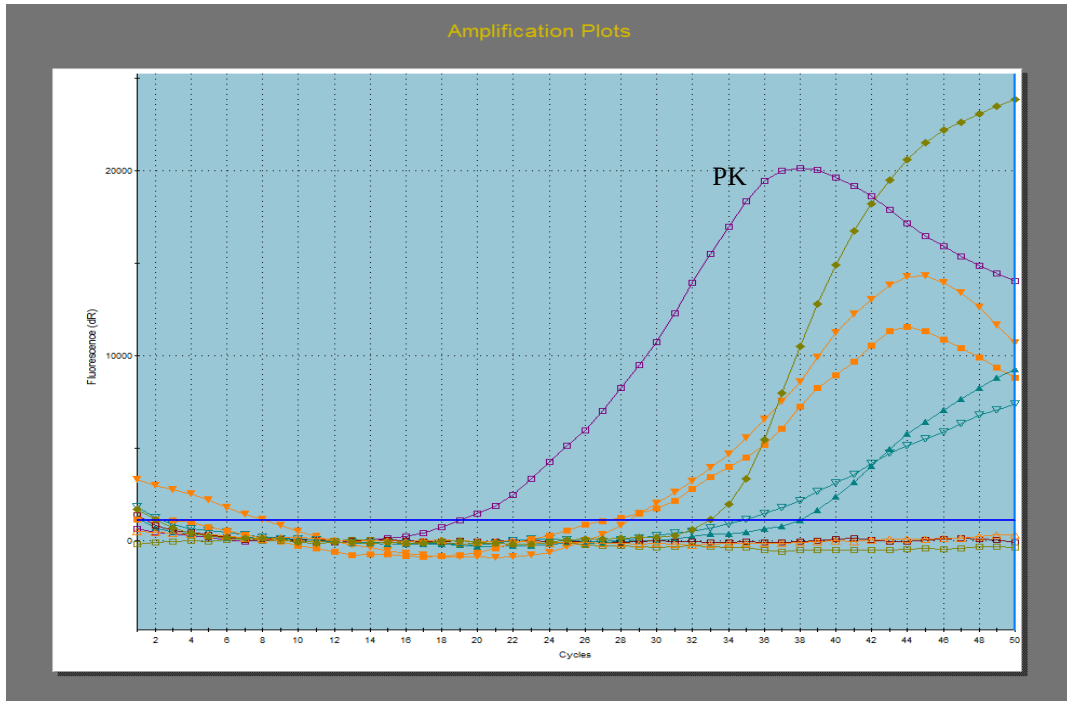
İncelemesi yapılan toplam 400 köpekten 218'i (%54,5) Real Time PCR analizleriyle vector-borne ve/veya food-borne protozoon enfeksiyonları yönünden pozitif bulunmuştur. Pozitif belirlenen örneklerin araştırma merkezlerine göre dağılımı Tablo 4.1'de verilmiştir. Pozitif belirlenen bazı örneklerin TaqMan prob tabanlı Real Time PCR'da spesifik primer ve problemlerle analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri ve Ct (dR) (Eşik değer siklusu) değerleri *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. gibsoni*, *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *H. canis* ve *N. caninum* için sırasıyla Şekil 4.1-4.7 ve Şekil 4.10-4.16'de verilmiştir. Ayrıca *T. gondii* ve *B. canis rossi* için Real Time PCR sonuçları da Şekil 4.8-4.9'da gösterilmiştir. *B. canis rossi* için dizayn edilen primer ve prob dizilerinin GenBank'ta mevcut tüm izolatlarla spesifikite analizlerinde *B. canis rossi* için spesifik olduğu görülmüştür ancak pozitif kontrol temin edilemediği için Real Time PCR analizlerinde referans kullanılamamıştır (Şekil 4.9). *E. canis* %14,5 ile en yaygın tür belirlenmiş olup bunu sırasıyla %12,0, %9,0, %7,8, %5,3, %3,8 ve %2,3 ile *B. canis canis*, *B. gibsoni*, *A. phagocytophilum*, *H. canis*, *N. caninum* ve *B. canis vogeli* takip etmiştir. İncelenen örneklerde *B. canis rossi* ve *T. gondii*'ye rastlanmamıştır. Pozitif belirlenen örneklerin 197'si (%90,4) tek türle enfekte bulunurken, 21'i (%9,6) iki türle miks enfekte saptanmıştır. Üç veya daha fazla türle miks enfeksiyona rastlanmamıştır. İki türle miks enfeksiyonlarda; *B. gibsoni* + *B. canis canis* 12 örnekte, *H. canis* + *B. canis canis* 4 örnekte, *A. phagocytophilum* + *H. canis* 3 örnekte; *E. canis* + *B. gibsoni* ise 2 örnekte saptanmıştır. Pozitif örneklerde ortalama Ct (dR) değerleri *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. gibsoni*, *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *H. canis* ve *N. caninum* için sırasıyla $32,2 \pm 0,8$, $31,6 \pm 2,2$, $33,4 \pm 0,9$, $34,0 \pm 0,8$, $34,2 \pm 1,0$, $34,4 \pm 1,1$ ve $38,4 \pm 0,5$ olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.1. İncelenen köpeklerde vector-borne ve food-borne protozoon enfeksiyonları yönünden pozitif belirlenen örneklerin araştırma merkezlerine göre dağılımı

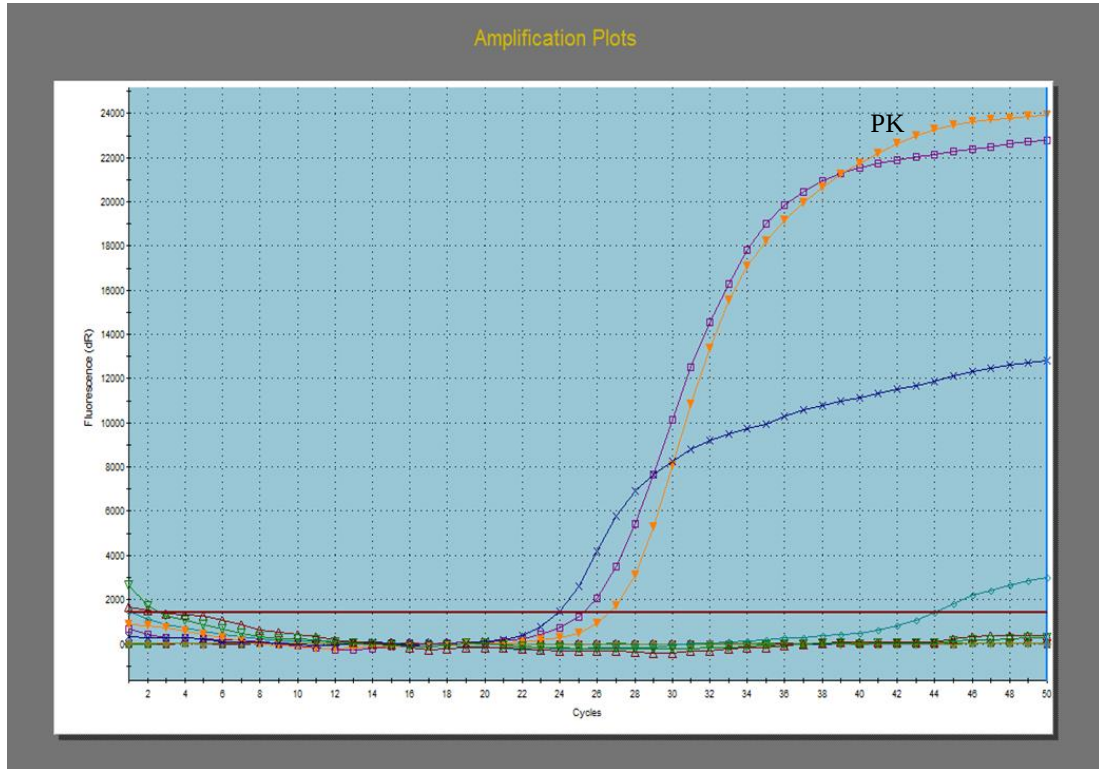
Araştırma Merkezi	İncelenen Hayvan Sayısı	Protozoon Türleri																		TOPLAM	
		<i>H. canis</i>		<i>B. gibsoni</i>		<i>B. canis canis</i>		<i>B. canis vogeli</i>		<i>B. canis rossi</i>		<i>T. gondii</i>		<i>E. canis</i>		<i>A. phagocytophilum</i>		<i>N. caninum</i>			
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Kayseri Merkez	200	12	6,0	17	8,5	22	11,0	3	1,5	0	0	0	0	34	17,0	18	9,0	10	5,0	116	58,0
İncesu	49	3	6,1	6	12,2	8	16,3	2	4,1	0	0	0	0	6	12,2	4	8,2	2	4,1	31	63,3
Pınarbaşı	26	0	0,0	3	11,5	4	15,4	1	3,8	0	0	0	0	3	11,5	2	7,7	1	3,8	14	53,8
Felahiye	25	2	8,0	2	8,0	3	12,0	0	0,0	0	0	0	0	3	12,0	2	8,0	0	0,0	12	48,0
Talas	46	2	4,3	3	6,5	4	8,7	1	2,2	0	0	0	0	5	10,9	3	6,5	2	4,3	20	43,5
Tomarza	24	0	0,0	2	8,3	3	12,5	0	0,0	0	0	0	0	3	12,5	0	0,0	0	0,0	8	33,3
Yahyalı	30	2	6,7	3	10,0	4	13,3	2	6,7	0	0	0	0	4	13,3	2	6,7	0	0,0	17	56,7
TOPLAM	400	21	5,3	36	9,0	48	12,0	9	2,3	0	0	0	0	58	14,5	31	7,8	15	3,8	218	54,5



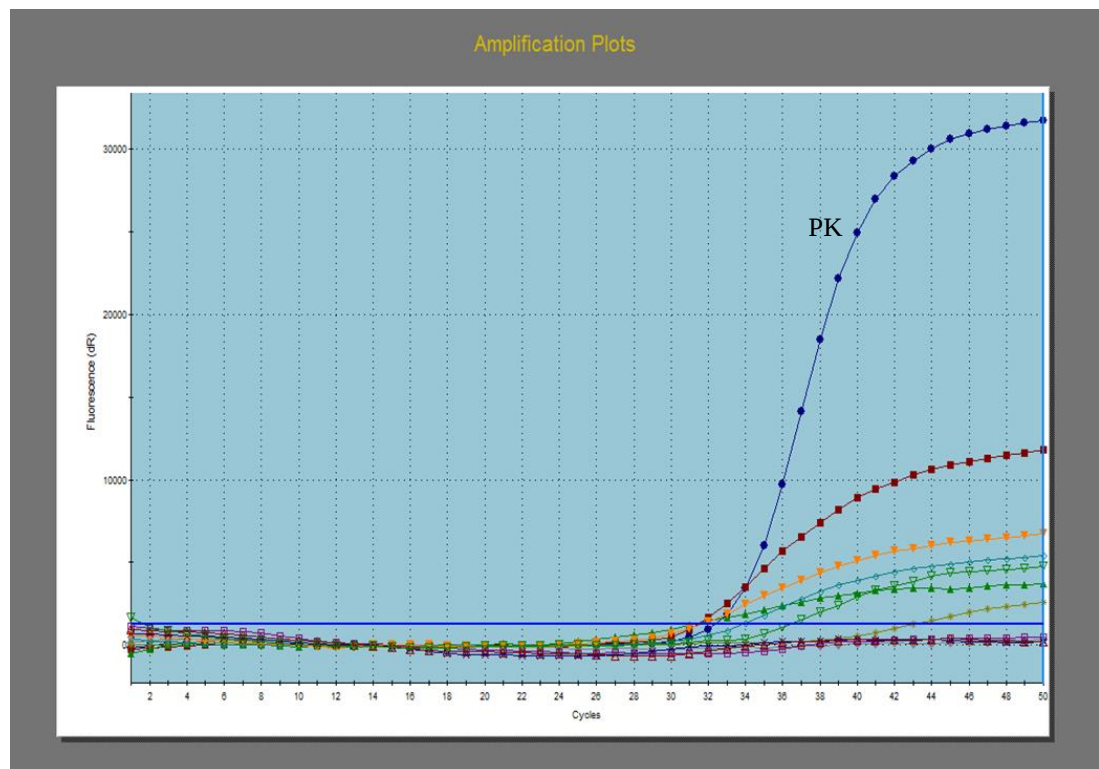
Şekil 4.1. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu *B. canis canis* pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri, PK: Pozitif Kontrol



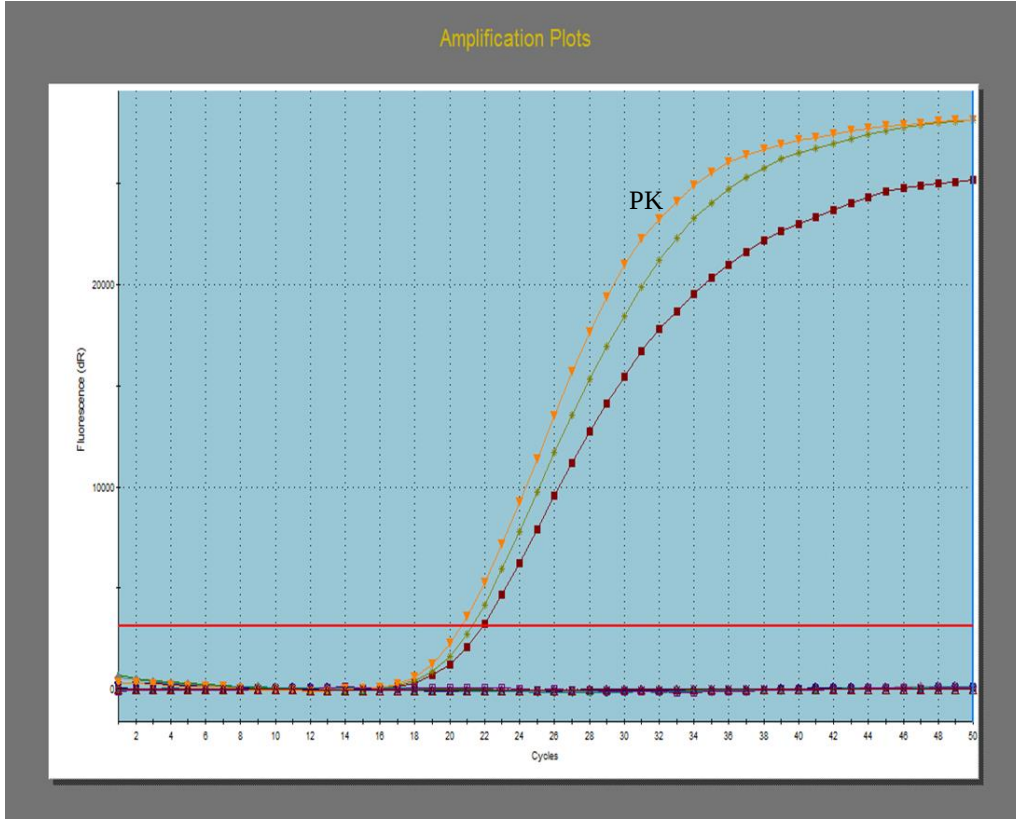
Şekil 4.2. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu *B. canis vogeli* pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri, PK: Pozitif Kontrol



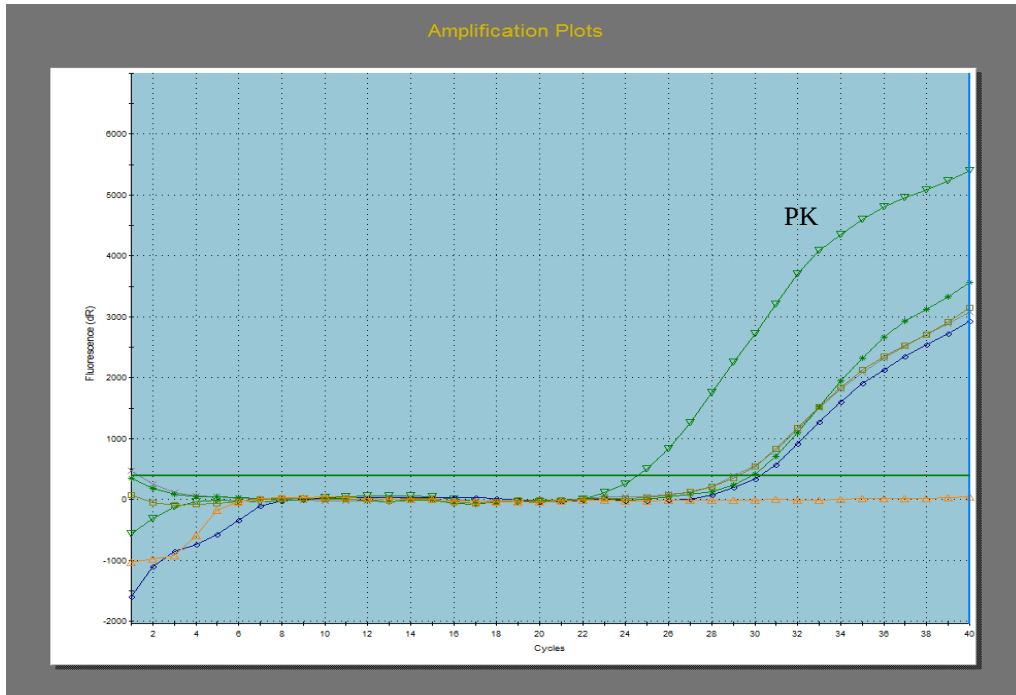
Şekil 4.3. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu *B. gibsoni* pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri, PK: Pozitif Kontrol



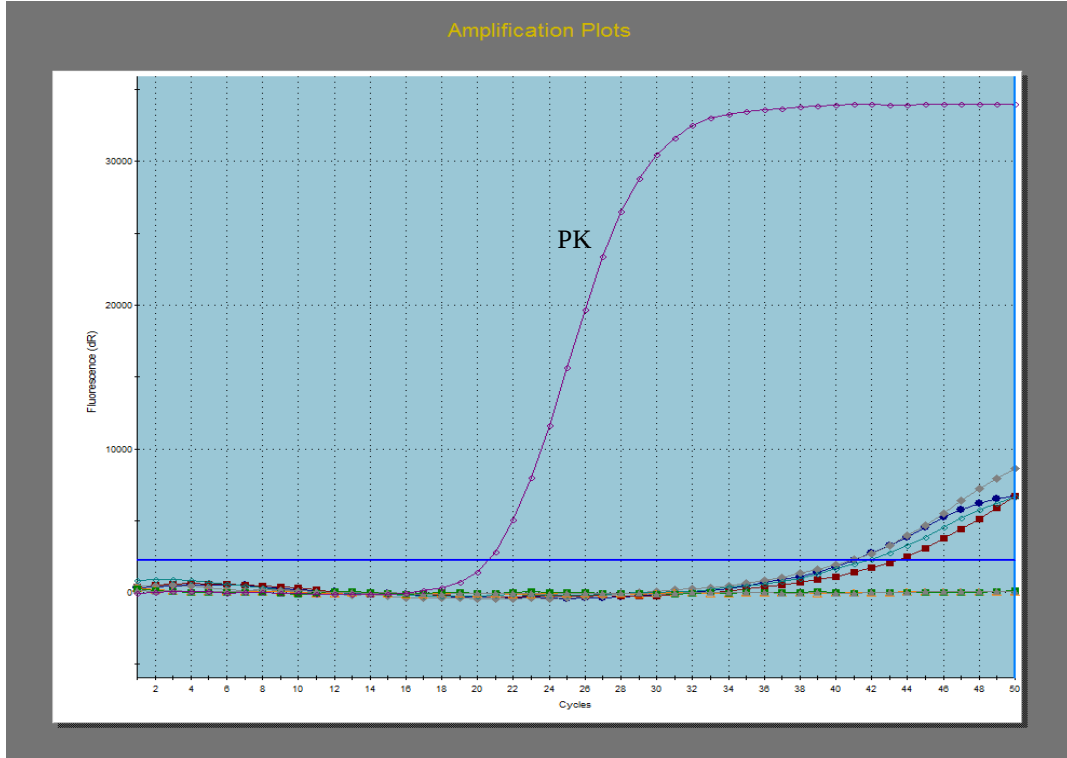
Şekil 4.4. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu *E. canis* pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri, PK: Pozitif Kontrol



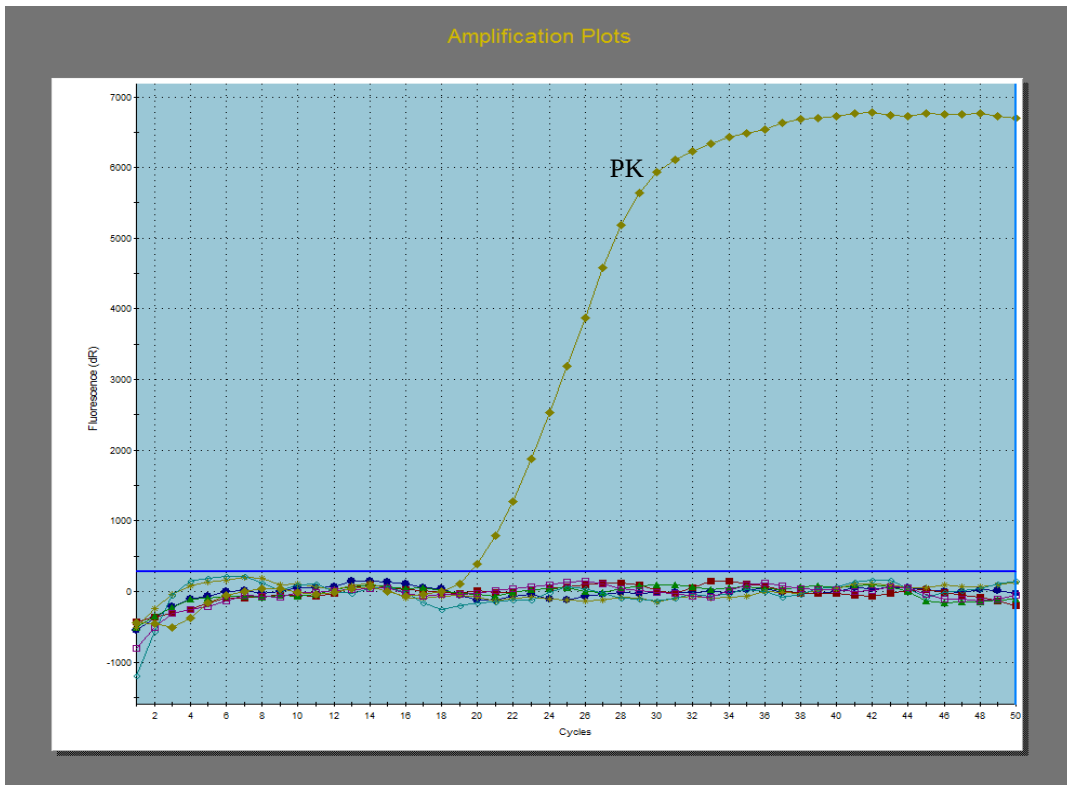
Şekil 4.5. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu *A. phagocytophilum* pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri, PK: Pozitif Kontrol



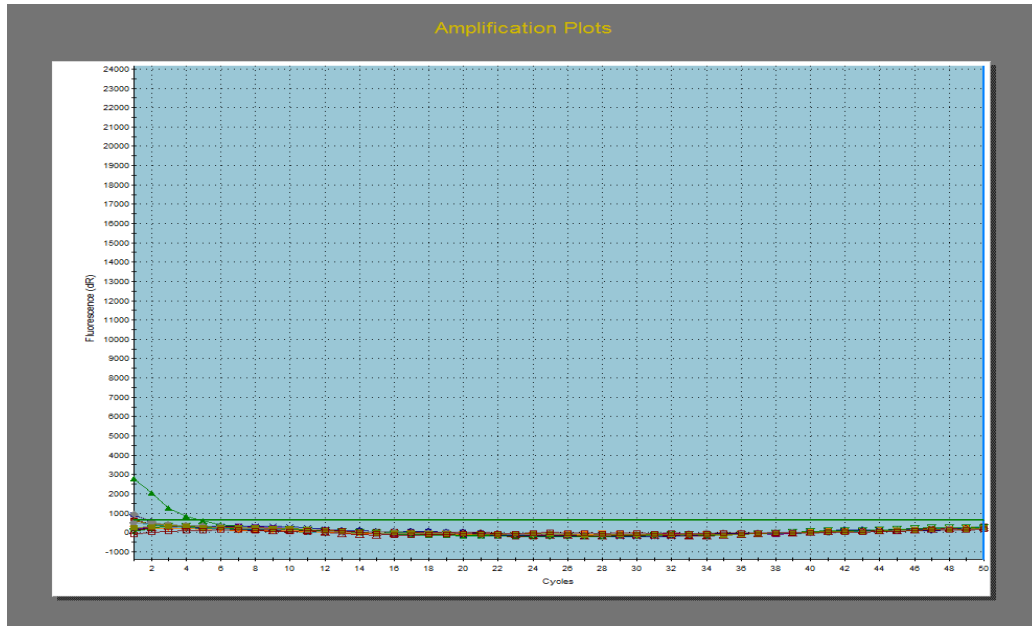
Şekil 4.6. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu *H. canis* pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri, PK: Pozitif Kontrol



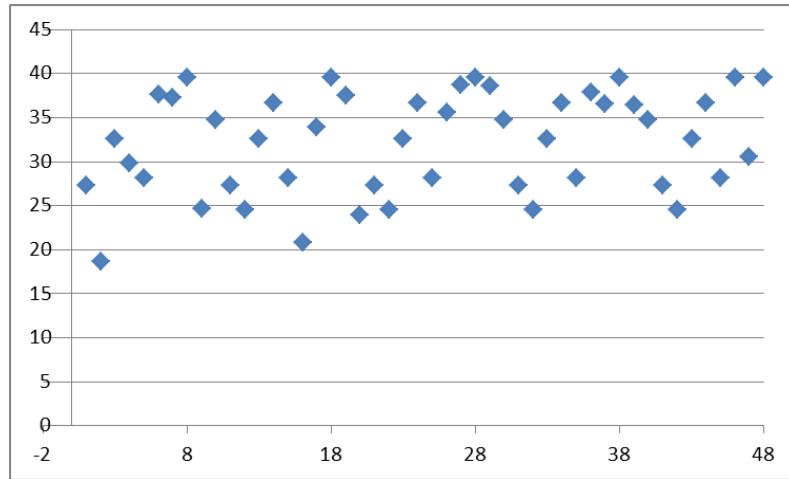
Şekil 4.7. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu *N. caninum* pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri, PK: Pozitif Kontrol



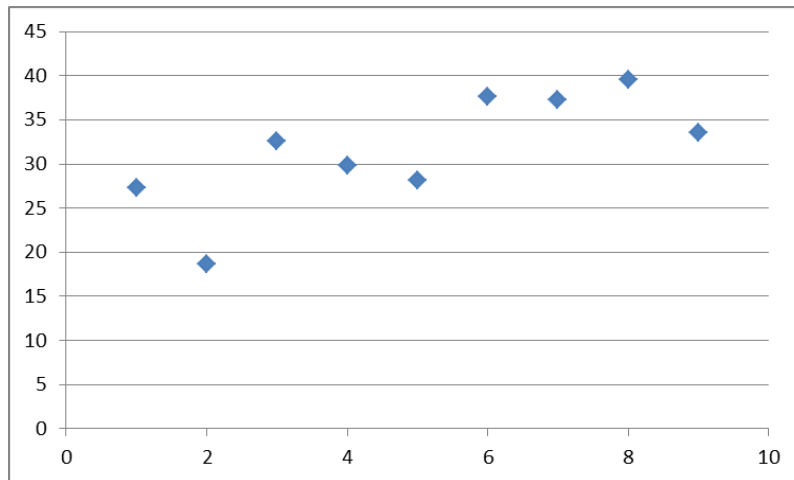
Şekil 4.8. *T. gondii* için TaqMan Real Time PCR analiz sonuçları, PK: Pozitif Kontrol



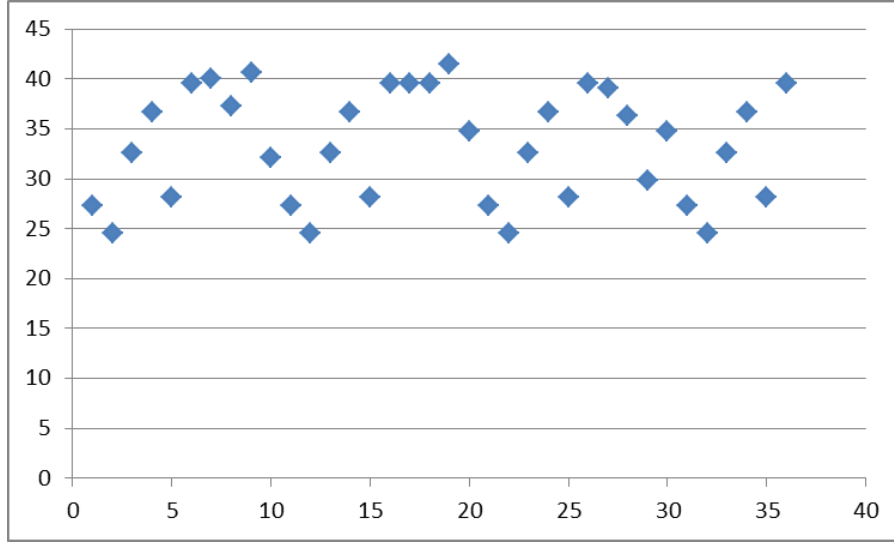
Şekil 4.9. *B. canis rossi* için TaqMan Real Time PCR analiz sonuçları



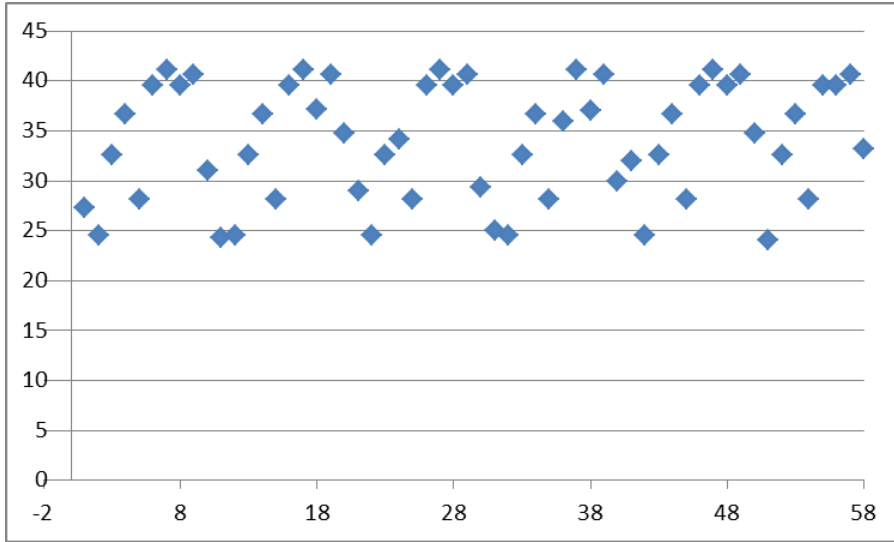
Şekil 4.10. Real Time PCR'da *B. canis canis* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı



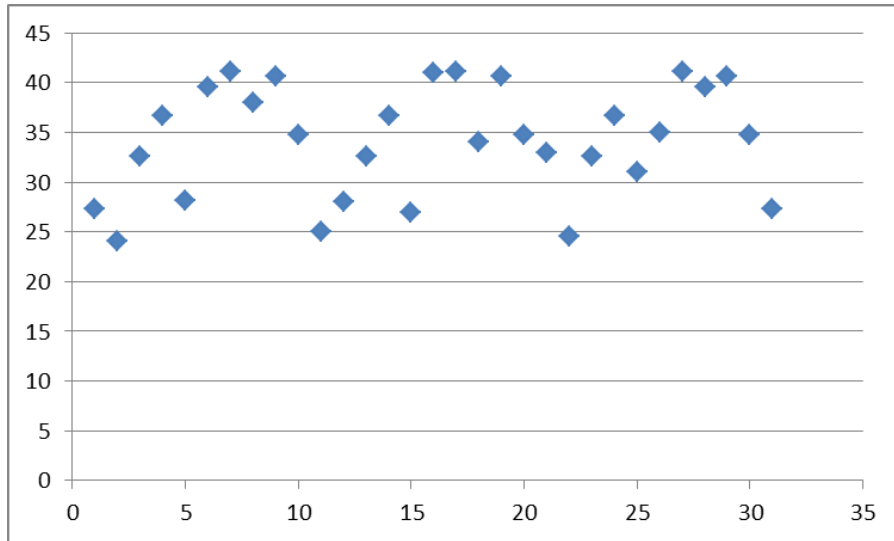
Şekil 4.11. Real Time PCR'da *B. canis vogeli* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı



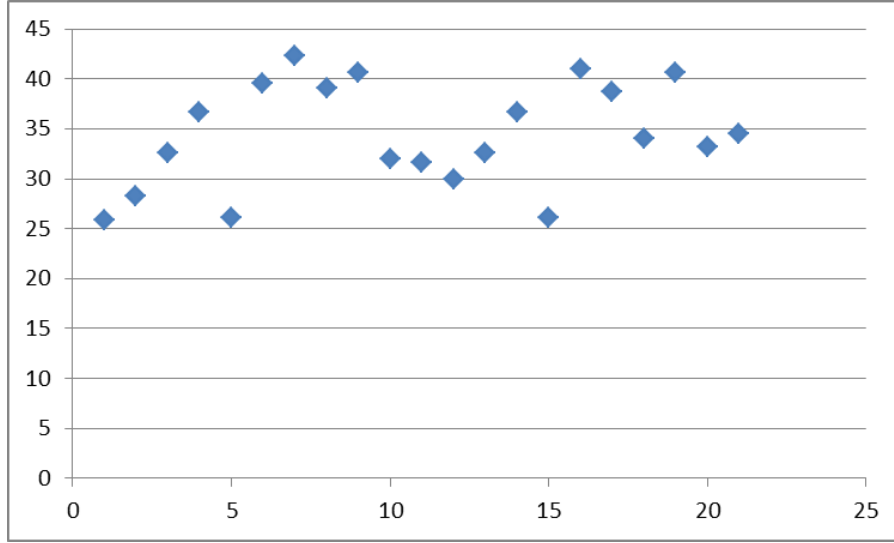
Şekil 4.12. Real Time PCR'da *B. gibsoni* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı



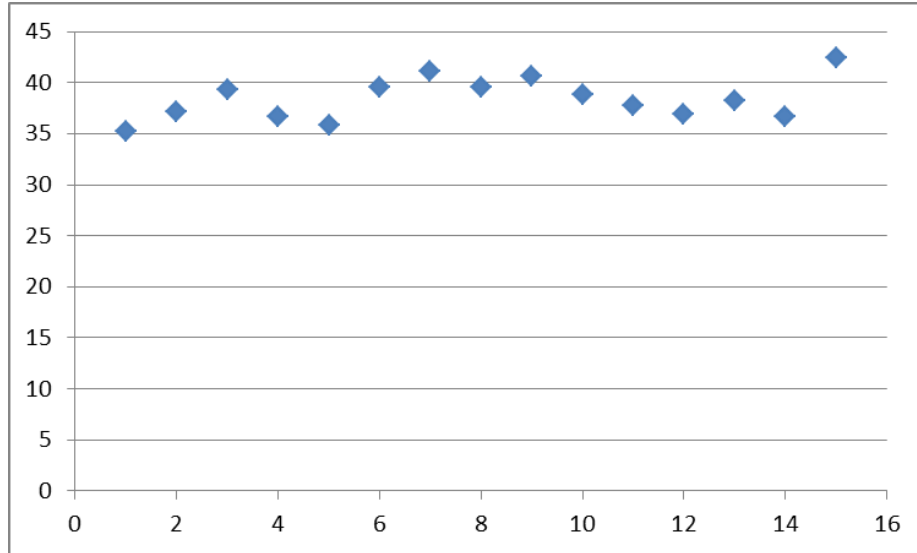
Şekil 4.13. Real Time PCR'da *E. canis* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı



Şekil 4.14. Real Time PCR'da *A. phagocytophilum* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı



Şekil 4.15. Real Time PCR’da *H. canis* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı



Şekil 4.16. Real Time PCR’da *N. caninum* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı

4.2. VECTOR-BORNE VE FOOD-BORNE PROTOZoon ENFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER PREVALANSINDA BAZI EPİDEMİYOLOJİK FAKTÖRLERİN ANALİZİ

Vector-borne ve food-borne protozoon enfeksiyonları yönünden pozitif belirlenen örneklerin parazit türü temel alınarak köpeklerin yaş, cinsiyet ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özelliklerine göre dağılımları ve istatistiksel verileri Tablo 4.2-4.8’de verilmiştir. Köpeklerin yaş gruplarına göre *B. canis canis*, *B. canis vogeli* ve *H. canis* prevalansı en yüksek 7-10 yaş grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla 4-6 ve 0,5-3 yaş grupları izlemiştir. *B. gibsoni* enfeksiyonu ise en yüksek 4-6 yaş grubunda tespit edilmiştir. 7-10 ve 4-6 yaş grupları arasında enfeksiyonun yayılışı açısından istatistiksel bir farklılık görülmezken ($p>0,05$), bu iki

yaş grubu ile 0,5-3 yaş grubu arasındaki farklılığın istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir. *E. canis*, *A. phagocytophilum* ve *N. caninum* enfeksiyonlarının yayılışında ise yaşa bağlı istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Tüm enfeksiyonlarda cinsiyet ve sahipli/sokak köpeği olma faktörlerine bağlı prevalans oranlarında istatistiksel bir farklılık ortaya çıkmazken ($p>0,05$), prevalans oranları büyük ırk köpeklerde (Kurt köpeği, Kangal, Çoban Köpeği ve melezleri vb.) küçük ırk (Beagle, Terrier, Cocker, Dachshund vb.) köpeklere oranla yüksek belirlenmiş olup bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 4.2. *B. canis canis* prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özellikleriyle ilişkisi

Faktör	İncelenen sığır sayısı	Enfekte köpek		χ^2	P
		Sayısı	%		
Yaş grupları (yıl)					
0,5-3	270	12	4,4 ^a	50,505	0,000
4-6	100	24	24,0 ^b		
7-10	30	12	40,0 ^b		
Cinsiyet					
Erkek	129	15	11,6	0,25*	1,000
Dişi	271	33	12,2		
İrk					
Küçük	156	10	6,4 ^a	7,567*	0,007
Büyük	244	38	15,6 ^b		
Sahipli/Sokak					
Sahipli	277	30	5,8	1,167*	0,317
Sokak	123	18	26,0		
Toplam	400	218	54,5		

χ^2 : Pearson Chi-Square, Fisher; *: Fisher's Exact Test; ^{a,b}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir.

Tablo 4.3. *B. canis vogeli* prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özellikleriyle ilişkisi

Faktör	İncelenen sığır sayısı	Enfekte köpek		χ^2	P
		Sayısı	%		
Yaş grupları (yıl)					
0,5-3	270	1	0,4 ^a	15,968	0,000
4-6	100	5	5,0 ^b		
7-10	30	3	10,0 ^b		
Cinsiyet					
Erkek	129	3	2,3	0,05*	1,000
Dişi	271	6	2,2		

İrk					
Küçük	156	1	0,6 ^a	3,010 [*]	0,047
Büyük	244	8	3,3 ^b		
Sahipli/Sokak					
Sahipli	277	6	2,2	0,029 [*]	1,000
Sokak	123	3	2,4		
Toplam	400	218	54,5		

χ^2 : Pearson Chi-Square, Fisher; *: Fisher's Exact Test; ^{a,b}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir.

Tablo 4.4. *B. gibsoni* prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özellikleriyle ilişkisi

Faktör	İncelenen sığır sayısı	Enfekte köpek		χ^2	P
		Sayısı	%		
Yaş grupları (yıl)					
0,5-3	270	6	2,2 ^a	47,049	0,000
4-6	100	24	24,0 ^b		
7-10	30	6	20,0 ^b		
Cinsiyet					
Erkek	129	10	7,8	0,362 [*]	0,709
Dişi	271	26	9,6		
İrk					
Küçük	156	7	4,5 ^a	6,359 [*]	0,012
Büyük	244	29	11,9 ^b		
Sahipli/Sokak					
Sahipli	277	24	8,7	0,124 [*]	0,709
Sokak	123	12	9,8		
Toplam	400	218	54,5		

χ^2 : Pearson Chi-Square, Fisher; *: Fisher's Exact Test; ^{a,b}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir.

Tablo 4.5. *E. canis* prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özellikleriyle ilişkisi

Faktör	İncelenen sığır sayısı	Enfekte köpek		χ^2	P
		Sayısı	%		
Yaş grupları (yıl)					
0,5-3	270	42	15,6	0,780	0,677
4-6	100	12	12,0		
7-10	30	4	13,3		
Cinsiyet					
Erkek	129	14	10,9	2,043*	0,173
Dişi	271	44	16,2		
İrk					

Küçük	156	13	8,3 ^a	7,844 [*]	0,005
Büyük	244	45	18,4 ^b		
Sahipli/Sokak					
Sahipli	277	41	14,8	0,878 [*]	0,465
Sokak	123	17	13,8		
Toplam	400	218	54,5		

χ^2 : Pearson Chi-Square, Fisher; *: Fisher's Exact Test; ^{a,b}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir.

Tablo 4.6. *A. phagocytophilum* prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özellikleriyle ilişkisi

Faktör	İncelenen sığır sayısı	Enfekte köpek		χ^2	P
		Sayısı	%		
Yaş grupları (yıl)					
0,5-3	270	21	7,8	0,058	0,971
4-6	100	8	8,0		
7-10	30	2	6,7		
Cinsiyet					
Erkek	129	11	8,5	0,161*	0,692
Dişi	271	20	7,4		
İrk					
Küçük	156	6	3,8 ^a	5,451*	0,021
Büyük	244	25	10,2 ^b		
Sahipli/Sokak					
Sahipli	277	20	7,2	0,354*	0,548
Sokak	123	11	8,9		
Toplam	400	218	54,5		

χ^2 : Pearson Chi-Square, Fisher; *: Fisher's Exact Test; ^{a,b}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir.

Tablo 4.7. *H. canis* prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özellikleriyle ilişkisi

Faktör	İncelenen sığır sayısı	Enfekte köpek		χ^2	P
		Sayısı	%		
Yaş grupları (yıl)					
0,5-3	270	4	1,5 ^a	23,723	0,000
4-6	100	13	13,0 ^b		
7-10	30	4	13,3 ^b		
Cinsiyet					
Erkek	129	9	7,0	1,141 [*]	0,338
Dişi	271	12	4,4		
İrk					

Küçük	156	3	1,9 ^a	5,690 [*]	0,020
Büyük	244	18	7,4 ^b		
Sahipli/Sokak					
Sahipli	277	15	5,4	0,049 [*]	1,000
Sokak	123	6	4,9		
Toplam	400	218	54,5		

χ^2 : Pearson Chi-Square, Fisher; *: Fisher's Exact Test; ^{a,b}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir.

Tablo 4.8. *N. caninum* prevalansının köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk ve sahipli/sokak köpeği olma özellikleriyle ilişkisi

Faktör	İncelenen sığır sayısı	Enfekte köpek		χ^2	P
		Sayısı	%		
Yaş grupları (yıl)					
0,5-3	270	8	3,0	1,603	0,449
4-6	100	5	5,0		
7-10	30	2	6,7		
Cinsiyet					
Erkek	129	7	5,4	1,482*	0,262
Dişi	271	8	3,0		
İrk					
Küçük	156	7	4,5	0,385*	0,594
Büyük	244	8	3,3		
Sahipli/Sokak					
Sahipli	277	9	3,2	0,626*	0,408
Sokak	123	6	4,9		
Toplam	400	218	54,5		

χ^2 : Pearson Chi-Square, Fisher
*: Fisher's Exact Test

4.3. SEKANS VE FİLOGENETİK ANALİZ SONUÇLARI

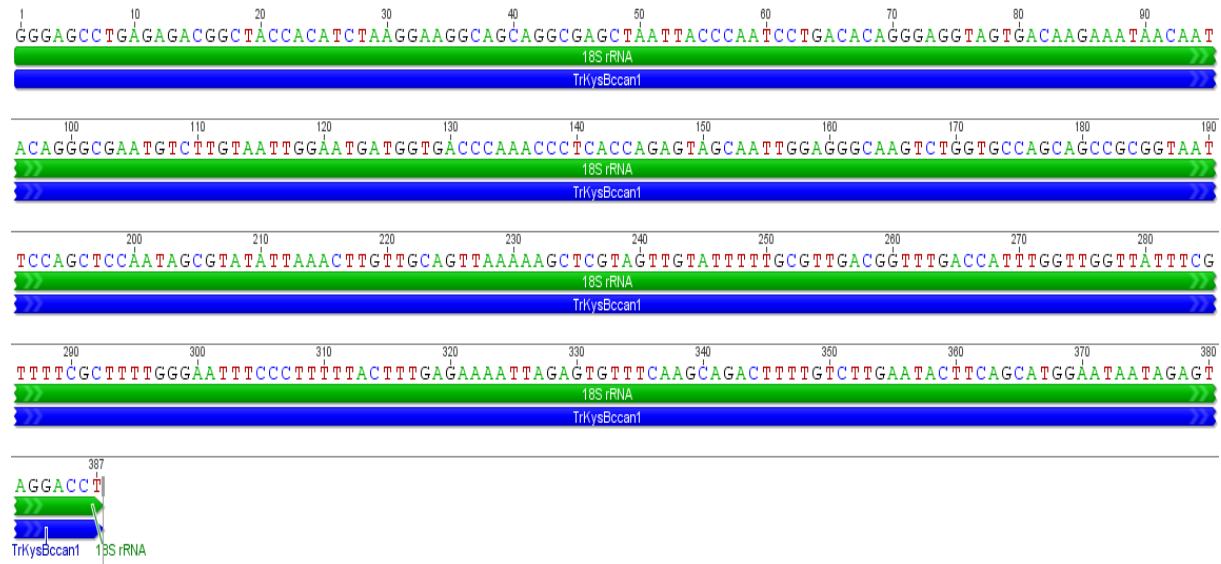
Araştırmada, *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. gibsoni*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* ve *H. canis* yönünden Real Time PCR analizlerinde pozitif belirlenen örneklerden jel üzerinde amplifikasyon veren ve uygun konsantrasyonda saptanan bazı izolatların sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Real Time PCR'da *N. caninum* belirlenen izolatların ise ilgili gen bölgesine göre jel üzerinde uygun görüntü vermediği ve konsantrasyonlarının düşük olması sebebiyle sekans analizleri gerçekleştirilememiştir.

4.3.1. *Babesia* türlerinin 18S rRNA Geninin Sekans ve Filogenetik Analiz Sonuçları

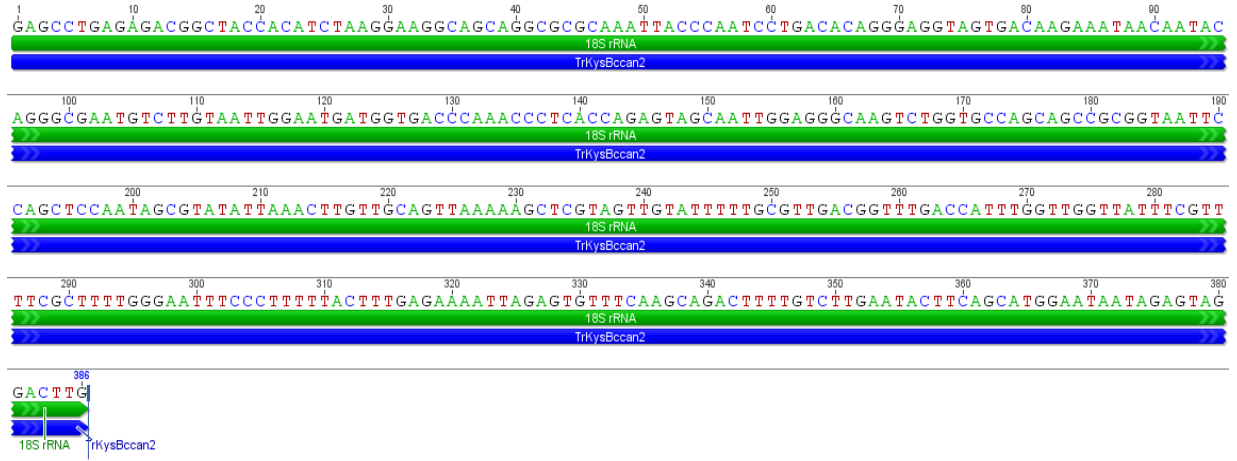
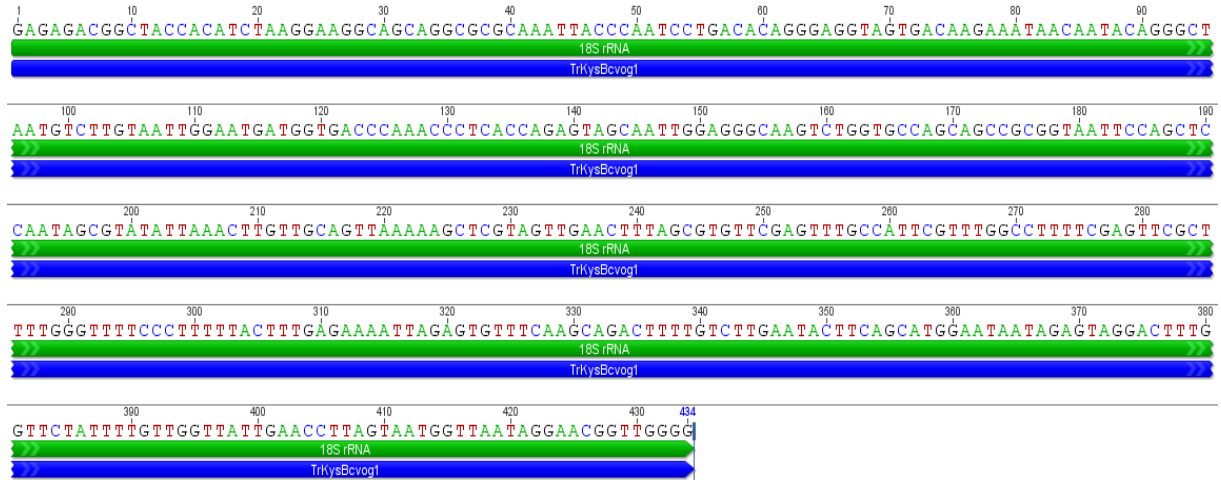
Real Time PCR analizlerinde pozitif belirlenen, jelde görüntü veren ve spektrofotometrik olarak uygun konsantrasyonda belirlenenlerden *B. canis canis* için 3, *B. canis vogeli* için 2, *B. gibsoni* için de 3 izolatin sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. *Babesia* türlerinin 18S rRNA Geni yönünden izolatlara ait DNA dizilerinin, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler olarak karakterize edilen tür dağılımı Tablo 4.9'de, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.17-4.24'de verilmiştir.

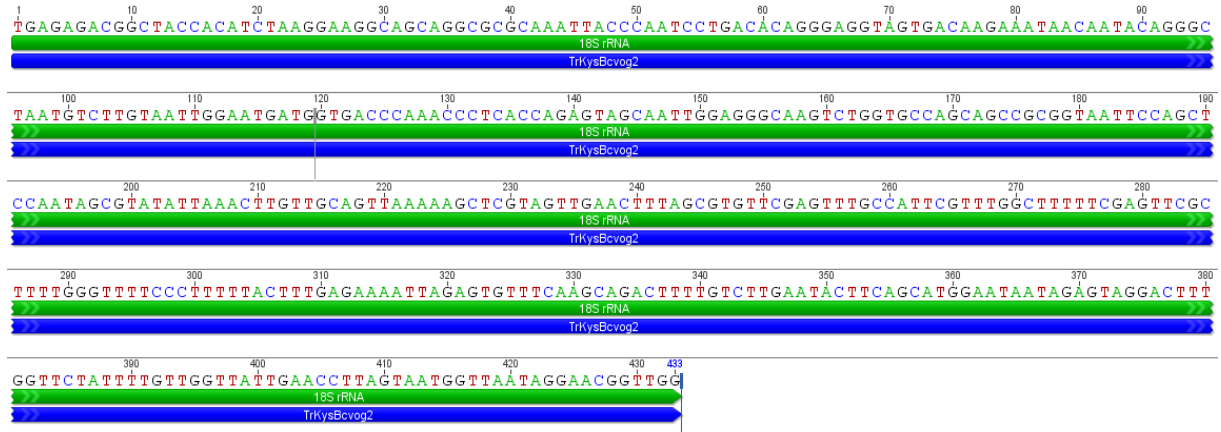
Tablo 4.9. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen *Babesia* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler

İzolat	Gen bölgesi	Konak ve izolasyon kaynağı	<i>Babesia</i> türü	Toplam Nükleotid Sayısı
TrKysBccan1	18S rRNA	Köpek/ kan	<i>B. canis canis</i>	387
TrKysBccan2	18S rRNA	Köpek/ kan	<i>B. canis canis</i>	386
TrKysBccan3	18S rRNA	Köpek/ kan	<i>B. canis canis</i>	388
TrKysBcvog1	18S rRNA	Köpek/ kan	<i>B. canis vogeli</i>	434
TrKysBcvog2	18S rRNA	Köpek/ kan	<i>B. canis vogeli</i>	433
TrKysBgib1	18S rRNA	Köpek/ kan	<i>B. gibsoni</i>	524
TrKysBgib2	18S rRNA	Köpek/ kan	<i>B. gibsoni</i>	522
TrKysBgib3	18S rRNA	Köpek/ kan	<i>B. gibsoni</i>	520

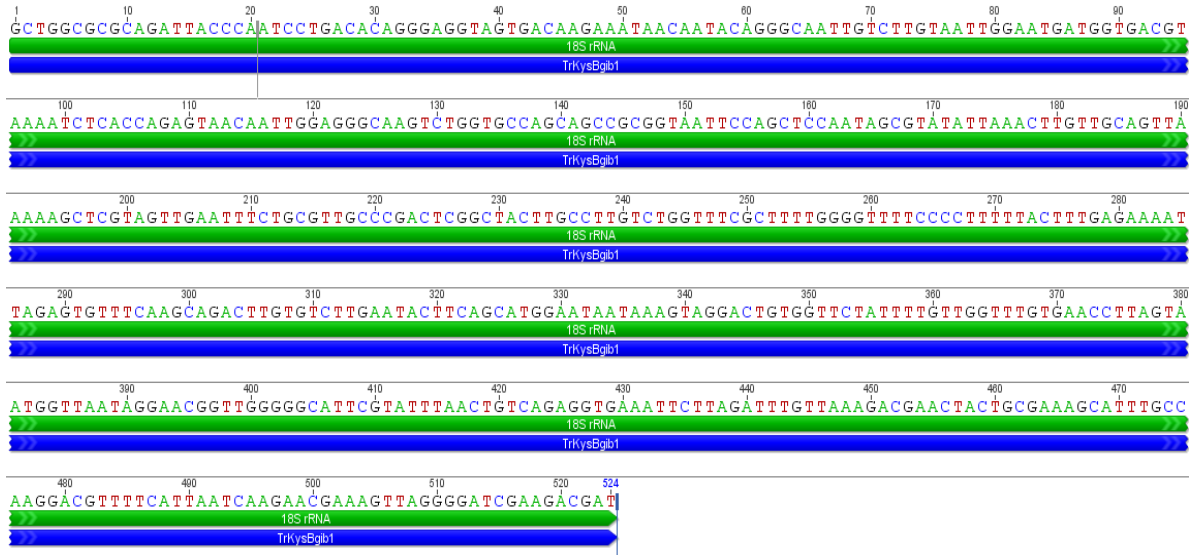


Şekil 4.17. *B. canis canis* TrKysBccan1 izolatının nükleotid dizilimi

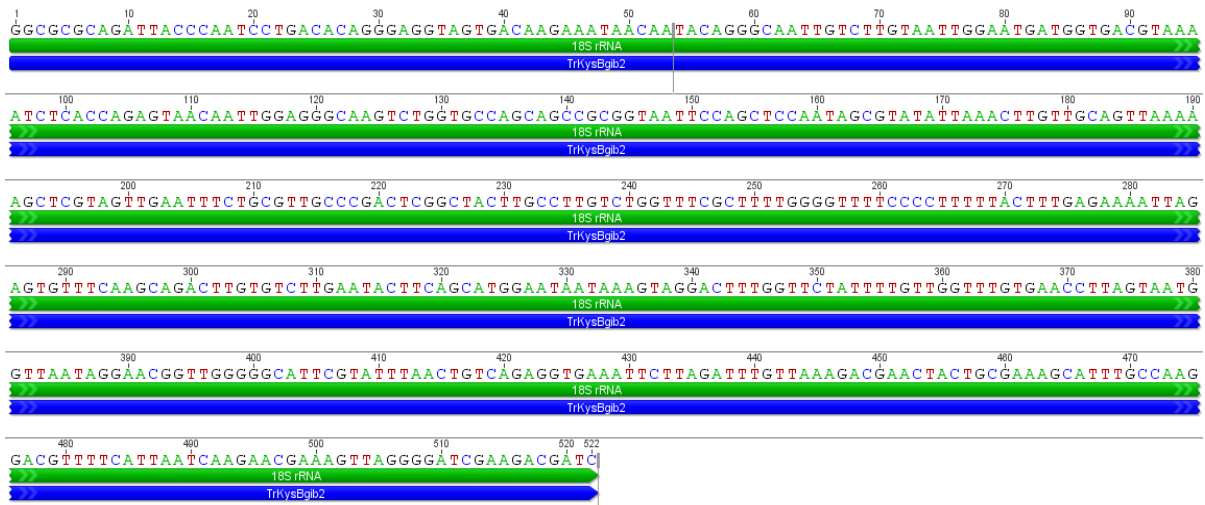
Şekil 4.18. *B. canis canis* TrKysBccan2 izolatının nükleotid dizilimiŞekil 4.19. *B. canis canis* TrKysBccan3 izolatının nükleotid dizilimiŞekil 4.20. *B. canis vogeli* TrKysBcvog1 izolatının nükleotid dizilimi



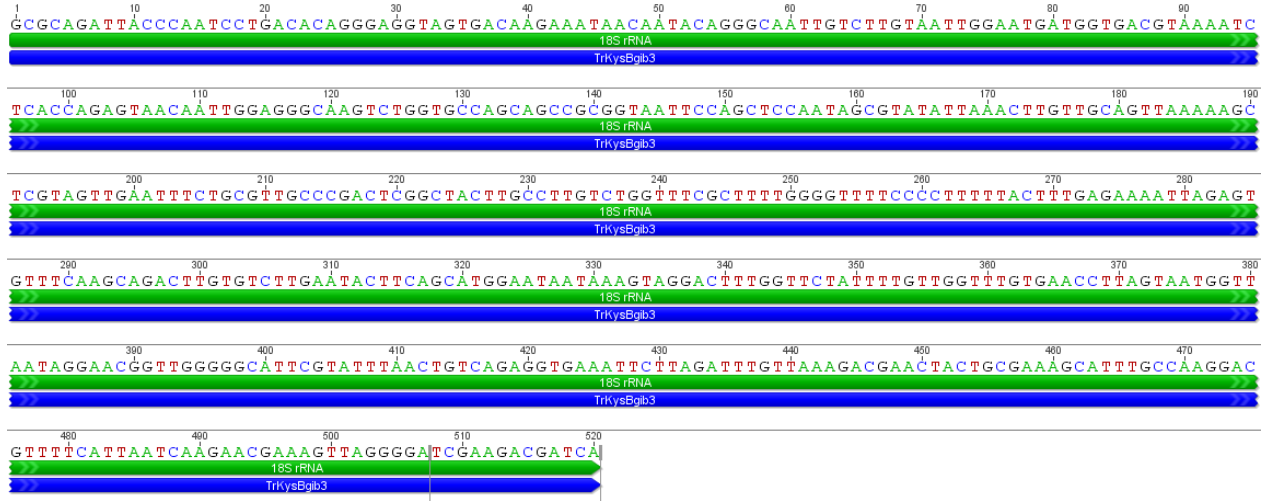
Şekil 4.21. *B. canis vogeli* TrKysBcvog2 izolatının nükleotid dizilimi



Şekil 4.22. *B. gibsoni* TrKysBgib1 izolatının nükleotid dizilimi



Şekil 4.23. *B. gibsoni* TrKysBgib2 izolatının nükleotid dizilimi



Şekil 4.24. *B. gibsoni* TrKysBgib3 izolatının nükleotid dizilimi

Araştırma yöresinde köpeklerden elde edilen *Babesia* izolatlarıyla 18S rRNA gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan Dünya'daki diğer bazı *Babesia* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank'tan alınarak Tablo 4.10'da gösterilmiştir.

Tablo 4.10. Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer *Babesia* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	Orijin	İzolasyon kaynağı	Türler	Aksesyon Numarası
-	Macaristan	Köpekten çıkarılan kene	<i>B. canis canis</i>	AY942185
-	Macaristan	Köpek kanı	<i>B. canis canis</i>	DQ174279
-	Macaristan	Köpekten çıkarılan kene	<i>B. canis canis</i>	DQ181654
M9	Macaristan	Köpekten çıkarılan kene	<i>B. canis canis</i>	DQ181656
bab-dog-1	Hırvatistan	Köpek kanı	<i>B. canis canis</i>	FJ913767
Turk1	Türkiye	Köpek kanı	<i>B. canis vogeli</i>	AM183215
Turk2	Türkiye	Köpek kanı	<i>B. canis vogeli</i>	AM183216
-	Brezilya	Köpek kanı	<i>B. canis vogeli</i>	AY371194
Coro1	Venezuela	Köpek kanı	<i>B. canis vogeli</i>	DQ297390
-	Brezilya	Kedi kanı	<i>B. canis vogeli</i>	EF636702
GO 17	Brezilya	Köpek kanı	<i>B. canis vogeli</i>	GU386282
SK-011	Saint Kitts ve Nevis Federasyonu	Köpek kanı	<i>B. canis vogeli</i>	JX112785
Okinawa 2	Japonya	Köpek kanı	<i>B. gibsoni</i>	AB478328
813B	Çin	Köpek kanı	<i>B. gibsoni</i>	HQ718716
854B	Çin	Köpek kanı	<i>B. gibsoni</i>	HQ718722
-	Hırvatistan	Köpek kanı	<i>B. gibsoni</i>	FJ209023

Kayseri yöresinde köpeklerde pozitif belirlenen ve nükleotid dizisi ortaya konan izolatlar ile Dünyanın çeşitli ülkelerinden multiple alignmentta dahil edilen diğer izolatların 18S rRNA gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Tablo 4.11'de, pairwise alignmentları ise Şekil 4.25'de verilmiştir.

Tablo 4.11. *Babesia* türleri yönünden multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları

İzolat/Aksesyon	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)	Toplam nükleotid sayısı
AB478328	29,0	19,9	25,4	25,6	54,5	45,5	1663,0
AM183215	32,4	17,0	26,8	23,8	59,2	40,8	407,0
AM183216	32,4	17,0	26,8	23,8	59,2	40,8	407,0
AY371194	29,2	19,6	25,1	26,1	54,3	45,7	1608,0
AY942185	32,8	16,0	27,2	24,0	60,0	40,0	412,0
DQ174279	32,9	16,2	27,1	23,9	59,9	40,1	414,0
DQ181654	28,1	18,7	27,9	25,3	56,0	44,0	391,0
DQ181656	32,8	15,9	27,5	23,9	60,2	39,8	415,0
DQ297390	29,2	19,5	25,2	26,1	54,5	45,5	1662,0
EF636702	30,3	17,9	26,9	24,9	57,2	42,8	442,0
FJ209023	31,5	18,2	26,3	24,0	57,9	42,1	501,0
FJ913767	32,6	16,3	27,3	23,8	59,9	40,1	319,0
GU386282	32,6	17,9	26,5	23,0	59,1	40,9	291,0
HQ718716	31,3	17,5	26,9	24,3	58,2	41,8	502,0
HQ718722	31,3	17,5	26,9	24,3	58,2	41,8	502,0
JX112785	29,1	18,1	27,1	25,7	56,2	43,8	746,0
TrKysBccan1	28,4	18,6	27,9	25,1	56,3	43,7	387,0
TrKysBccan2	28,5	18,7	28,0	24,9	56,5	43,5	386,0
TrKysBccan3	28,4	18,6	27,8	25,3	56,2	43,8	388,0
TrKysBcvog1	29,7	18,0	27,2	25,1	56,9	43,1	434,0
TrKysBcvog2	30,3	17,8	27,3	24,7	57,5	42,5	433,0
TrKysBgib1	30,2	17,0	27,9	25,0	58,0	42,0	524,0
TrKysBgib2	30,3	17,0	28,0	24,7	58,2	41,8	522,0
TrKysBgib3	30,4	16,9	28,3	24,4	58,7	41,3	520,0
Ortalama	30,2	18,2	26,6	25,0	56,8	43,2	594,8

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	AB478328																							
2	AM183215	0,081																						
3	AM183216	0,081	0,000																					
4	AY371194	0,556	0,005	0,005																				
5	AY942185	0,075	0,048	0,048	0,045																			
6	DQ174279	0,083	0,053	0,053	0,053	0,005																		
7	DQ181654	0,082	0,065	0,065	0,053	0,006	0,012																	
8	DQ181656	0,088	0,048	0,048	0,055	0,007	0,012	0,023																
9	DQ297390	0,577	0,005	0,005	0,000	0,045	0,053	0,053	0,055															
10	EF636702	0,074	0,005	0,005	0,000	0,044	0,049	0,051	0,054	0,000														
11	FJ209023	0,000	0,085	0,085	0,106	0,077	0,080	0,097	0,081	0,106	0,084													
12	FJ913767	0,092	0,062	0,062	0,055	0,003	0,003	0,010	0,003	0,055	0,055	0,091												
13	GU386282	0,101	0,007	0,007	0,000	0,061	0,061	0,061	0,061	0,000	0,000	0,099	0,061											
14	HQ718716	0,000	0,093	0,093	0,065	0,086	0,089	0,106	0,089	0,065	0,092	0,000	0,101	0,108										
15	HQ718722	0,000	0,093	0,093	0,065	0,086	0,089	0,106	0,089	0,065	0,092	0,000	0,101	0,108	0,000									
16	JX112785	0,071	0,005	0,005	0,000	0,045	0,053	0,053	0,055	0,000	0,000	0,062	0,055	0,000	0,070	0,070								
17	TrKysBccan1	0,083	0,062	0,062	0,054	0,006	0,012	0,005	0,015	0,054	0,054	0,093	0,006	0,061	0,102	0,102	0,054							
18	TrKysBccan2	0,077	0,062	0,062	0,048	0,003	0,009	0,003	0,021	0,048	0,049	0,093	0,006	0,061	0,102	0,102	0,048	0,008						
19	TrKysBccan3	0,086	0,065	0,065	0,056	0,009	0,015	0,005	0,018	0,056	0,057	0,097	0,010	0,061	0,106	0,106	0,056	0,000	0,008					
20	TrKysBcvog1	0,079	0,000	0,000	0,005	0,050	0,055	0,057	0,060	0,005	0,005	0,090	0,062	0,007	0,098	0,098	0,005	0,061	0,055	0,063				
21	TrKysBcvog2	0,079	0,003	0,003	0,002	0,047	0,053	0,054	0,058	0,002	0,002	0,090	0,059	0,003	0,098	0,098	0,002	0,058	0,052	0,060	0,002			
22	TrKysBgib1	0,006	0,087	0,087	0,068	0,080	0,088	0,096	0,093	0,068	0,086	0,002	0,095	0,101	0,002	0,002	0,069	0,099	0,093	0,102	0,090	0,091		
23	TrKysBgib2	0,002	0,084	0,084	0,064	0,078	0,086	0,090	0,091	0,064	0,082	0,000	0,092	0,101	0,000	0,000	0,065	0,094	0,087	0,096	0,086	0,086	0,002	
24	TrKysBgib3	0,002	0,084	0,084	0,065	0,078	0,086	0,091	0,088	0,065	0,082	0,000	0,092	0,101	0,000	0,000	0,066	0,095	0,088	0,097	0,086	0,087	0,002	0,000

Şekil 4.25. *Babesia* izolatlarının ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların 18S rRNA gen dizilimlerinin pairwise analizleri

Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *Babesia* izolatları ile Dünya'da GenBank'a kayıtlı benzer diğer bazı izolatların, parsiyel 18S rRNA gen bölgelerinin multible alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.26'de gösterilmiştir.

	340	350	360	370	380	390	400	410
1. AB478328	GGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCCATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGAC							
2. AM183215							AATTACCCAATCCTGAC	
3. AM183216							AATTACCCAATCCTGAC	
4. AY371194	GGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCCATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGAC							
5. AY942185							GCAAATTACCCAATCCTGAC	
6. DQ174279							GCAAATTACCCAATCCTGAC	
7. DQ181654							GCAAATTACCCAATCCTGAC	
8. DQ181656							GCAAATTACCCAATCCTGAC	
9. DQ297390	GGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCCATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGAC							
10. EF636702							CCTGAGAGACGGCTACCCATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGAC	
11. FJ209023								
12. FJ913767								
13. GU386282								
14. HQ718716								
15. HQ718722								
16. JX112785	GGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCCATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGAC							
17. TrkysBccan1							GAGGAGCCTGAGAGACGGCTACCCATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGAC	
18. TrkysBccan2							GAGGAGCCTGAGAGACGGCTACCCATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGAC	
19. TrkysBccan3							GAGGAGCCTGAGAGACGGCTACCCATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGAC	
20. TrkysBcvog1							GAGGAGCCTGAGAGACGGCTACCCATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGAC	
21. TrkysBcvog2							TGAGAGACGGCTACCCATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGAC	
22. TrkysBgib1							GCAGGCGCGCAATTACCCAATCCTGAC	
23. TrkysBgib2							GCAGGCGCAATTACCCAATCCTGAC	
24. TrkysBgib3							GCAGGCAATTACCCAATCCTGAC	
	420	430	440	450	460	470	480	490
1. AB478328	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
2. AM183215	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
3. AM183216	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
4. AY371194	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
5. AY942185	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
6. DQ174279	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
7. DQ181654	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
8. DQ181656	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
9. DQ297390	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
10. EF636702	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
11. FJ209023								
12. FJ913767	AGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
13. GU386282	AGAAATAACAATACAGGGC							
14. HQ718716								
15. HQ718722								
16. JX112785	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
17. TrkysBccan1	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
18. TrkysBccan2	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
19. TrkysBccan3	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
20. TrkysBcvog1	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
21. TrkysBcvog2	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
22. TrkysBgib1	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
23. TrkysBgib2	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							
24. TrkysBgib3	ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC							

	500	510	520	530	540	550	560	570	580
1. AB478328	A	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA							
2. AM183215	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
3. AM183216	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
4. AY371194	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
5. AY942185	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
6. DQ174279	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
7. DQ181654	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
8. DQ181656	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
9. DQ297390	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
10. EF636702	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
11. FJ209023	ATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
12. FJ913767	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
13. GU386282	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
14. HQ1718716	A	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA							
15. HQ1718722	A	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA							
16. JX112785	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
17. TrKysBccan1	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
18. TrKysBccan2	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
19. TrKysBccan3	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
20. TrKysBcvog1	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
21. TrKysBcvog2	AGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA								
22. TrKysBgib1	A	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA							
23. TrKysBgib2	A	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA							
24. TrKysBgib3	A	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAA							

	590	600	610	620	630	640	650	660				
1. AB478328	GCTCGTAGTTGAATTT	TGCGTTG	CCGAGT	GGCTA	---	TTG	CCTT	GTCTGG	TTTCGCTTTTGGG	GT	TTT	CCCTTTTTA
2. AM183215	GCTCGTAGTTGAATTT	TCG	TGTTTCGAGTT	GCCATTCGTTTGGC	TTTTCGAG	TTTCGCTTTTGGG	---	TTTTCCTTTTTA				
3. AM183216	GCTCGTAGTTGAATTT	TCG	TGTTTCGAGTT	GCCATTCGTTTGGC	TTTTCGAG	TTTCGCTTTTGGG	---	TTTTCCTTTTTA				
4. AY371194	GCTCGTAGTTGAATTT	TCG	TGTTTCGAGTT	GCCATTCGTTTGGC	TTTTCGAG	TTTCGCTTTTGGG	---	TTTTCCTTTTTA				
5. AY942185	GCTCGTAGTTG	ATTTTTGCGTTG	-CG	TTTG	CCATT	GGTTGG	TTTTCG	TTTTCGCTTTTGGG	AA	TTT	-CCCTTTTTA	
6. DQ174279	GCTCGTAGTTG	ATTTTTGCGTTG	-CG	TTTG	CCATT	GGTTGG	TTTTCG	TTTTCGCTTTTGGG	AA	TTT	-CCCTTTTTA	
7. DQ181654	GCTCGTAGTTG	ATTTTTGCGTTG	-CG	TTTG	CCATT	GGTTGG	TTTTCG	TTTTCGCTTTTGGG	AA	TTT	-CCCTTTTTA	
8. DQ181656	GCTCGTAGTTG	ATTTTTGCGTT	-CG	TTTG	CCATT	GGTTGG	TTTTCG	TTTTCGCTTTTGGG	AA	TTT	-CCCTTTTTA	
9. DQ297390	GCTCGTAGTTGAATTT	TCG	TGTTTCGAGTT	GCCATTCGTTTGGC	TTTTCGAG	TTTCGCTTTTGGG	---	TTTTCCTTTTTA				
10. EF636702	GCTCGTAGTTGAATTT	TCG	TGTTTCGAGTT	GCCATTCGTTTGGC	TTTTCGAG	TTTCGCTTTTGGG	---	TTTTCCTTTTTA				
11. FJ209023	GCTCGTAGTTGAATTT	TGCGTTG	CCGAGT	GGCTA	---	TTG	CCTT	GTCTGG	TTTCGCTTTTGGG	GT	TTT	CCCTTTTTA
12. FJ913767	GCTCGTAGTTG	ATTTTTGCGTT	-CG	TTTG	CCATT	GGTTGG	TTTTCG	TTTTCGCTTTTGGG	AA	TTT	-CCCTTTTTA	
13. GU386282	GCTCGTAGTTGAATTT	TCG	TGTTTCGAGTT	GCCATTCGTTTGGC	TTTTCGAG	TTTCGCTTTTGGG	---	TTTTCCTTTTTA				
14. HQ1718716	GCTCGTAGTTGAATTT	TGCGTTG	CCGAGT	GGCTA	---	TTG	CCTT	GTCTGG	TTTCGCTTTTGGG	GT	TTT	CCCTTTTTA
15. HQ1718722	GCTCGTAGTTGAATTT	TGCGTTG	CCGAGT	GGCTA	---	TTG	CCTT	GTCTGG	TTTCGCTTTTGGG	GT	TTT	CCCTTTTTA
16. JX112785	GCTCGTAGTTGAATTT	TCG	TGTTTCGAGTT	GCCATTCGTTTGGC	TTTTCGAG	TTTCGCTTTTGGG	---	TTTTCCTTTTTA				
17. TrKysBccan1	GCTCGTAGTTG	ATTTTTGCGTTG	-CG	TTTG	CCATT	GGTTGG	TTTTCG	TTTTCGCTTTTGGG	AA	TTT	-CCCTTTTTA	
18. TrKysBccan2	GCTCGTAGTTG	ATTTTTGCGTTG	-CG	TTTG	CCATT	GGTTGG	TTTTCG	TTTTCGCTTTTGGG	AA	TTT	-CCCTTTTTA	
19. TrKysBccan3	GCTCGTAGTTG	ATTTTTGCGTTG	-CG	TTTG	CCATT	GGTTGG	TTTTCG	TTTTCGCTTTTGGG	AA	TTT	-CCCTTTTTA	
20. TrKysBcvog1	GCTCGTAGTTGAATTT	TCG	TGTTTCGAGTT	GCCATTCGTTTGGC	TTTTCGAG	TTTCGCTTTTGGG	---	TTTTCCTTTTTA				
21. TrKysBcvog2	GCTCGTAGTTGAATTT	TCG	TGTTTCGAGTT	GCCATTCGTTTGGC	TTTTCGAG	TTTCGCTTTTGGG	---	TTTTCCTTTTTA				
22. TrKysBgib1	GCTCGTAGTTGAATTT	TGCGTTG	CCGAGT	GGCTA	---	TTG	CCTT	GTCTGG	TTTCGCTTTTGGG	GT	TTT	CCCTTTTTA
23. TrKysBgib2	GCTCGTAGTTGAATTT	TGCGTTG	CCGAGT	GGCTA	---	TTG	CCTT	GTCTGG	TTTCGCTTTTGGG	GT	TTT	CCCTTTTTA
24. TrKysBgib3	GCTCGTAGTTGAATTT	TGCGTTG	CCGAGT	GGCTA	---	TTG	CCTT	GTCTGG	TTTCGCTTTTGGG	GT	TTT	CCCTTTTTA

	670	680	690	700	710	720	730	740
1. AB478328	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTGTGCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
2. AM183215	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
3. AM183216	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
4. AY371194	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
5. AY942185	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
6. DQ174279	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
7. DQ181654	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
8. DQ181656	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
9. DQ297390	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
10. EF636702	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
11. FJ209023	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTGTGCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
12. FJ913767	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
13. GU386282	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTCAGCATGGAATAA					
14. HQ718716	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTGTGCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
15. HQ718722	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTGTGCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
16. JX112785	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
17. TrKysBccan1	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
18. TrKysBccan2	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
19. TrKysBccan3	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
20. TrKysBcvog1	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
21. TrKysBcvog2	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTTTGTCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
22. TrKysBgib1	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTGTGCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
23. TrKysBgib2	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTGTGCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				
24. TrKysBgib3	CTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC	CAAGCAGACTTGTGCTTGA	ATACTTC-AGCATGGAATAATA	AGTAGGACTTTGGTTCTA				

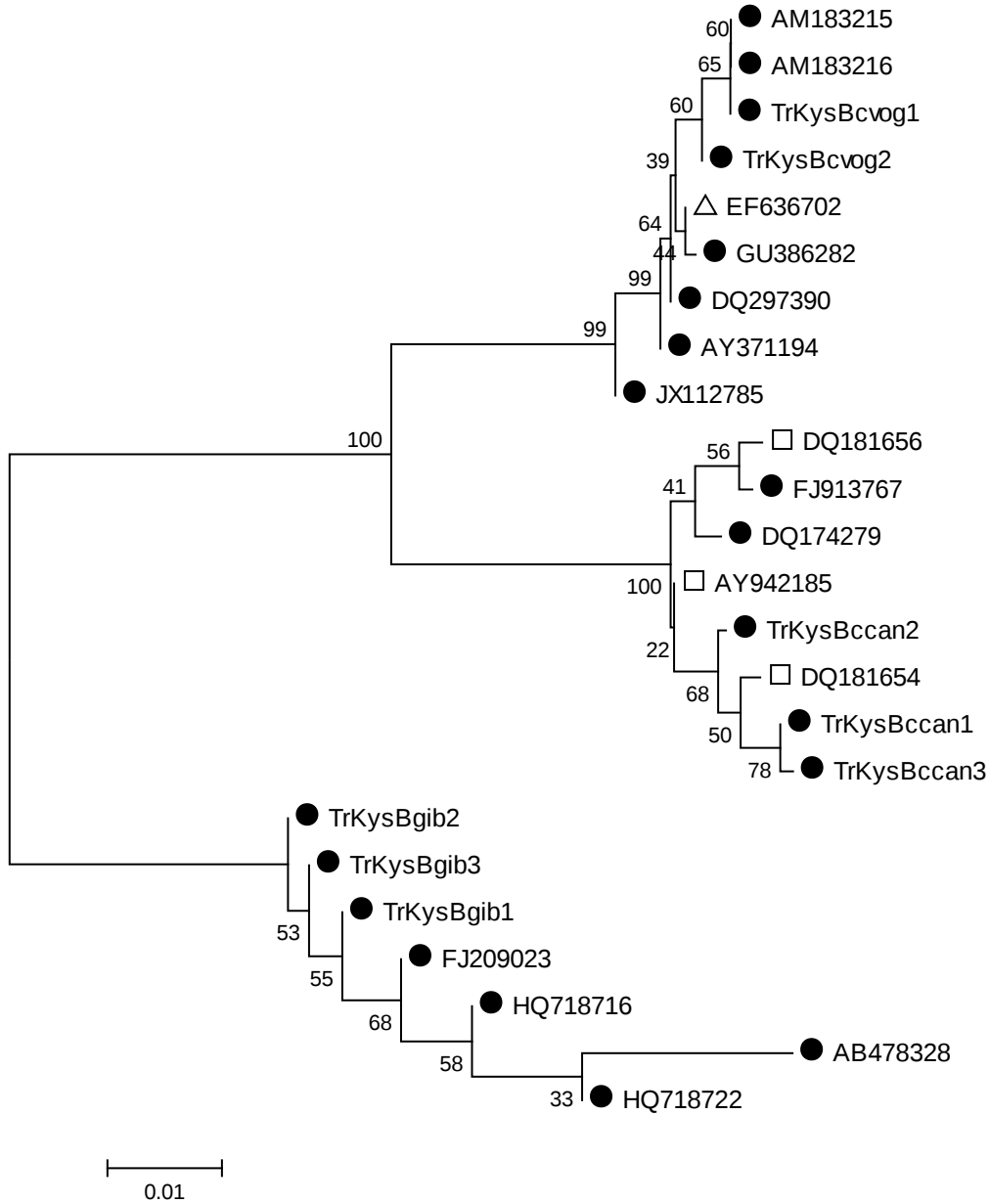
	750	760	770	780	790	800	810	820	830
1. AB478328	TTTTGTTGGTTTGTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAACTGTCAGAGGT	GAAATTCCTT					
2. AM183215	TTTTGTTGGTTATTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAA						
3. AM183216	TTTTGTTGGTTATTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAA						
4. AY371194	TTTTGTTGGTTATTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAACTGTCAGAGGT	GAAATTCCTT					
5. AY942185	TTTTGTTGGTTATTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAA						
6. DQ174279	TTTTGTTGGTTATTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAA						
7. DQ181654									
8. DQ181656	TTTTGTTGGTTATTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAA						
9. DQ297390	TTTTGTTGGTTATTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAACTGTCAGAGGT	GAAATTCCTT					
10. EF636702	TTTTGTTGGTTATTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAACTGTCAGAGGT	GAAATTCCTT					
11. FJ209023	TTTTGTTGGTTTGTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAACTGTCAGAGGT	GAAATTCCTT					
12. FJ913767									
13. GU386282									
14. HQ718716	TTTTGTTGGTTTGTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAACTGTCAGAGGT	GAAATTCCTT					
15. HQ718722	TTTTGTTGGTTTGTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAACTGTCAGAGGT	GAAATTCCTT					
16. JX112785	TTTTGTTGGTTATTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAACTGTCAGAGGT	GAAATTCCTT					
17. TrKysBccan1									
18. TrKysBccan2									
19. TrKysBccan3									
20. TrKysBcvog1	TTTTGTTGGTTATTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGG							
21. TrKysBcvog2	TTTTGTTGGTTATTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGG							
22. TrKysBgib1	TTTTGTTGGTTTGTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAACTGTCAGAGGT	GAAATTCCTT					
23. TrKysBgib2	TTTTGTTGGTTTGTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAACTGTCAGAGGT	GAAATTCCTT					
24. TrKysBgib3	TTTTGTTGGTTTGTGAACCTTAG	TAAATAGGAACGGTTGGGGGCA	-TTCGTATTTAACTGTCAGAGGT	GAAATTCCTT					

	840	850	860	870	880	890	900	910
1. AB478328	AGATT	TGTTAAAGACGA	ACTACTGCGAAAGC	ATTTGCCAAGGACG	TTTTTCATTAATCA	AGAACGAAAGTTAG	GGGATCGAAGA	
2. AM183215								
3. AM183216								
4. AY371194	AGATT	TGTTAAAGACGA	ACTACTGCGAAAGC	ATTTGCCAAGGACG	TTTTTCATTAATCA	AGAACGAAAGTTAG	GGGATCGAAGA	
5. AY942185								
6. DQ174279								
7. DQ181654								
8. DQ181656								
9. DQ297390	AGATT	TGTTAAAGACGA	ACTACTGCGAAAGC	ATTTGCCAAGGACG	TTTTTCATTAATCA	AGAACGAAAGTTAG	GGGATCGAAGA	
10. EF636702								
11. FJ209023	AGATT	TGTTAAAGACGA	ACTACTGCGAAAGC	ATTTGCCAAGGACG	TTTTTCATTAATCA	AGAACGAAAGTTAG	GGGATCGAAGA	
12. FJ913767								
13. GU386282								
14. HQ718716	AGATT	TGTTAAAGACGA	ACTACTGCGAAAGC	ATTTGCCAAGGACG	TTTTTCATTAATCA	AGAACGAAAGTTAG	GGGATCGAAGA	
15. HQ718722	AGATT	TGTTAAAGACGA	ACTACTGCGAAAGC	ATTTGCCAAGGACG	TTTTTCATTAATCA	AGAACGAAAGTTAG	GGGATCGAAGA	
16. JX112785	AGATT	TGTTAAAGACGA	ACTACTGCGAAAGC	ATTTGCCAAGGACG	TTTTTCATTAATCA	AGAACGAAAGTTAG	GGGATCGAAGA	
17. TrKysBccan1								
18. TrKysBccan2								
19. TrKysBccan3								
20. TrKysBcvog1								
21. TrKysBcvog2								
22. TrKysBgib1	AGATT	TGTTAAAGACGA	ACTACTGCGAAAGC	ATTTGCCAAGGACG	TTTTTCATTAATCA	AGAACGAAAGTTAG	GGGATCGAAGA	
23. TrKysBgib2	AGATT	TGTTAAAGACGA	ACTACTGCGAAAGC	ATTTGCCAAGGACG	TTTTTCATTAATCA	AGAACGAAAGTTAG	GGGATCGAAGA	
24. TrKysBgib3	AGATT	TGTTAAAGACGA	ACTACTGCGAAAGC	ATTTGCCAAGGACG	TTTTTCATTAATCA	AGAACGAAAGTTAG	GGGATCGAAGA	
	020	030	040	050	060	070	080	090
1. AB478328	CGATCAGATACCG	TCGTAGTCCTAAC	CATAAACCATGCC	GACTAGGGATTGG	AGGTCGTCATTT	TC-GAC	TCCTTCAG	ACC
2. AM183215								
3. AM183216								
4. AY371194	CGATCAGATACCG	TCGTAGTCCTAAC	CATAAACCATGCC	GACTAGG	ATTGGAGGTCG	TCGTTTTGCT	GAC	TCCTTCAG
5. AY942185								
6. DQ174279								
7. DQ181654								
8. DQ181656								
9. DQ297390	CGATCAGATACCG	TCGTAGTCCTAAC	CATAAACCATGCC	GACTAGG	ATTGGAGGTCG	TCGTTTTGCT	GAC	TCCTTCAG
10. EF636702								
11. FJ209023	CGATCAGATACCG	TCGTAGTCCTAAC	CATAAACCATGCC	GACTAGGG	ATTGGAGGTCG	TCATTTTC-GAC	TCCTTCAG	ACC
12. FJ913767								
13. GU386282								
14. HQ718716	CGATCAGATACCG	TCGTAGTCCTAAC	CATAAACCATGCC	GACTAGGG	ATTGGAGGTCG	TCATTT		
15. HQ718722	CGATCAGATACCG	TCGTAGTCCTAAC	CATAAACCATGCC	GACTAGGG	ATTGGAGGTCG	TCATTT		
16. JX112785								
17. TrKysBccan1								
18. TrKysBccan2								
19. TrKysBccan3								
20. TrKysBcvog1								
21. TrKysBcvog2								
22. TrKysBgib1	CGAT							
23. TrKysBgib2	CGATC							
24. TrKysBgib3	CGATCA							

Şekil 4.26. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen *Babesia* izolatları ile Dünyadaki diğer bazı *Babesia* izolatlarının parsiyel 18S rRNA gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları

Şekil 4.26’de görüldüğü gibi 18S rRNA gen bölgesine göre saptanan *Babesia* türlerine ait izolatlar arasında türe özgü olarak çeşitli nükleotid değişimleri, delesyonları ve insertionları belirlenmiştir. *B. canis canis*, *B. canis vogeli* ve *B. gibsoni* belirlenen izolatların pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında ve dünyadan alignmentta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında sırasıyla ortalama $1,4 \pm 0,2$, $0,3 \pm 0,2$ ve $0,9 \pm 0,3$ farklılık saptanmıştır. Ayrıca *B. canis canis* ve *B. canis vogeli* grupları arasında $5,9 \pm 1,1$, *B. canis canis* ve *B. gibsoni* grupları arasında $14,1 \pm 1,7$ ve *B. canis vogeli* ve *B. gibsoni* grupları arasında ise $14,9 \pm 1,4$ oranında genetik farklılık belirlenmiştir.

Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *Babesia* izolatları ile Dünyadan benzer diğer bazı izolatların Neighbor Joining Metodu (Kimura 2 Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.27’de verilmiştir. Filogenetik ağaçta da görüleceği üzere saptanan izolatların tür bazlı olarak kendi gruplarında yer aldığı belirlenmiştir.



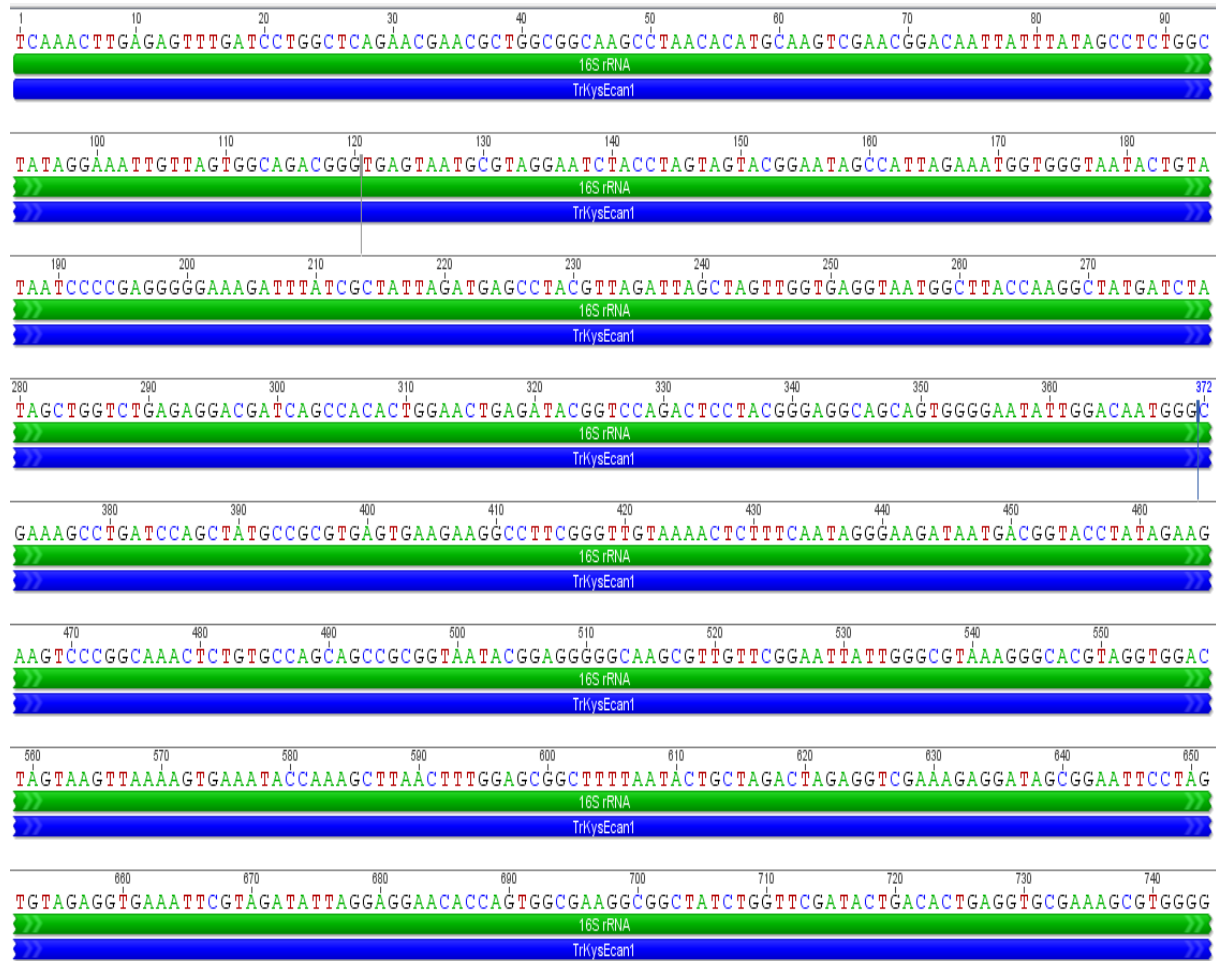
Şekil 4.27. Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *Babesia* izolatları ile GenBank’a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların 18S rRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter modeli). Semboller; □ : Kene, ● : Köpek, △ : Kedi izolatları

4.3.2. *Ehrlichia canis*'in 16S rRNA Geninin Sekans ve Filogenetik Analiz Sonuçları

Real Time PCR analizlerinde *E. canis* yönünden pozitif belirlenen, jelde görüntü veren ve spektrofotometrik olarak uygun konsantrasyonda belirlenen izolatlardan 3'ünün sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA geni yönünden *E. canis* izolatlarına ait DNA dizileri, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler olarak karakterize edilen tür dağılımı Tablo 4.12'de, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.28-4.30'da verilmiştir.

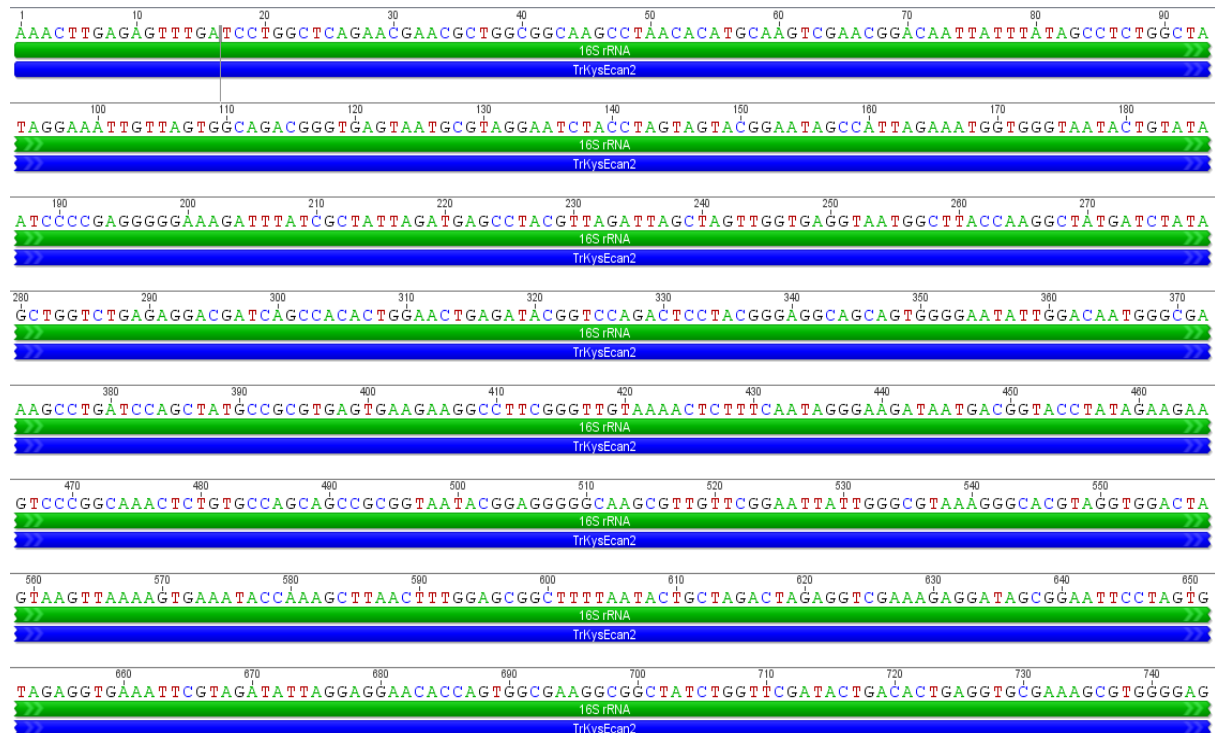
Tablo 4.12. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen *Ehrlichia* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler

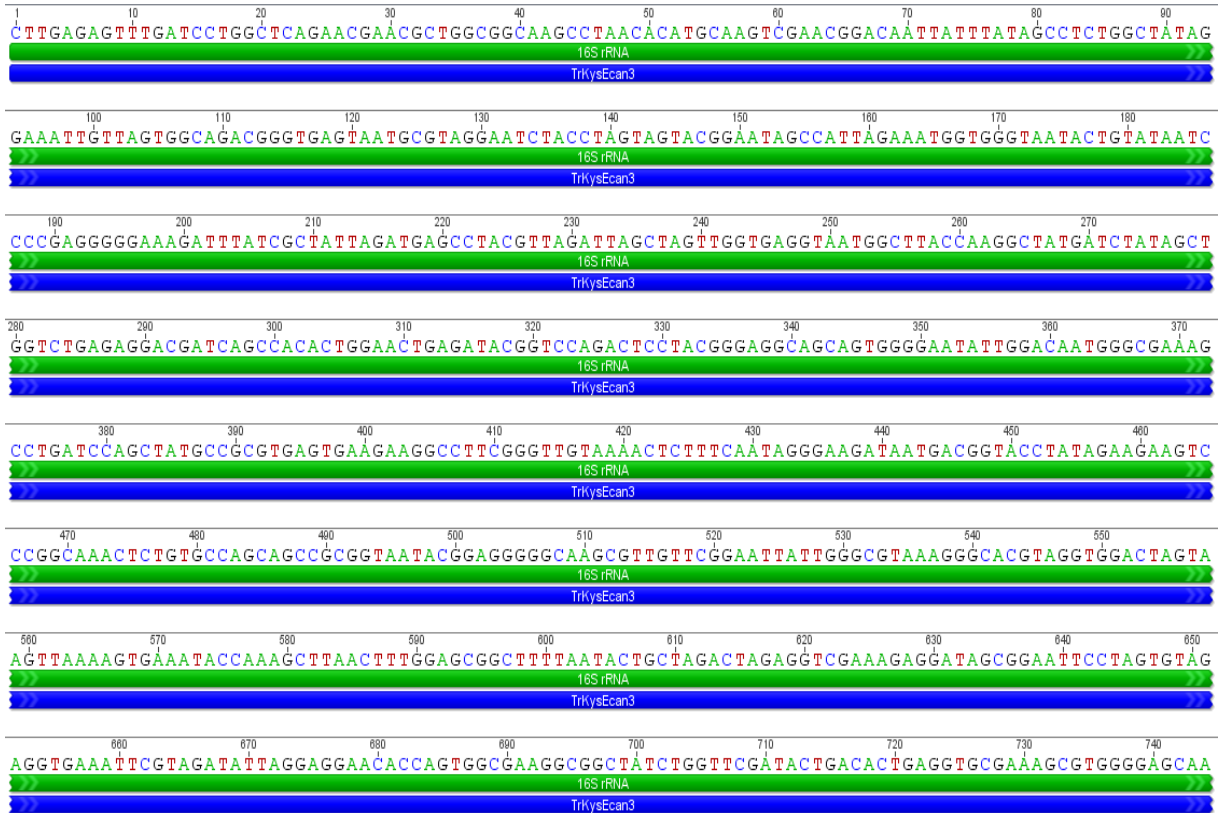
İzolat	Gen bölgesi	Konak ve izolasyon kaynağı	<i>Ehrlichia</i> türü	Toplam Nükleotid Sayısı
TrKysEcan1	16S rRNA	Köpek/ kan	<i>E. canis</i>	1513
TrKysEcan2	16S rRNA	Köpek/ kan	<i>E. canis</i>	1508
TrKysEcan3	16S rRNA	Köpek/ kan	<i>E. canis</i>	1507





Şekil 4.28. *E. canis* TrKysEcan1 izolatının nükleotid dizilimi



Şekil 4.29 *E. canis* TrKysEcan2 izolatının nükleotid dizilimi



Şekil 4.30. *E. canis* TrKysEcan2 izolatının nükleotid dizilimi

Araştırma yöresinde köpeklerden elde edilen *E. canis* izolatlarıyla 16S rRNA gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan Dünya'daki diğer bazı *Ehrlichia* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank'tan alınarak Tablo 4.13'de gösterilmiştir.

Tablo 4.13. Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer *Ehrlichia* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	Orijin	İzolasyon kaynağı	Türler	Aksesyon Numarası
W-137J	Japonya	Vahşi kedi	<i>E. canis</i>	AB723710
CMM-19 (2006)	Japonya	Vahşi kedi	<i>E. canis</i>	AB723712
Gzh982	Çin	Köpek	<i>E. canis</i>	AF162860
VDE	Venezuela	Köpek	<i>E. canis</i>	AF373613
Kutahya	Türkiye	Köpek	<i>E. canis</i>	AY621071
GR21	Yunanistan	Köpek	<i>E. canis</i>	EF011110
TWN1	Tayvan	Köpek	<i>E. canis</i>	EU106856
Nero	İtalya	Köpek	<i>E. canis</i>	EU439944
Bareilly	Hindistan	Köpek	<i>E. canis</i>	JX861392

Kayseri yöresinde köpeklerde *E. canis* yönünden pozitif belirlenen ve nükleotid dizisi ortaya konan izolatlar ile Dünyanın çeşitli ülkelerinden multiple alignmentta dahil edilen diğer izolatların 16S rRNA gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Tablo 4.14'de, pairwise alignmentları ise Şekil 4.31'de verilmiştir.

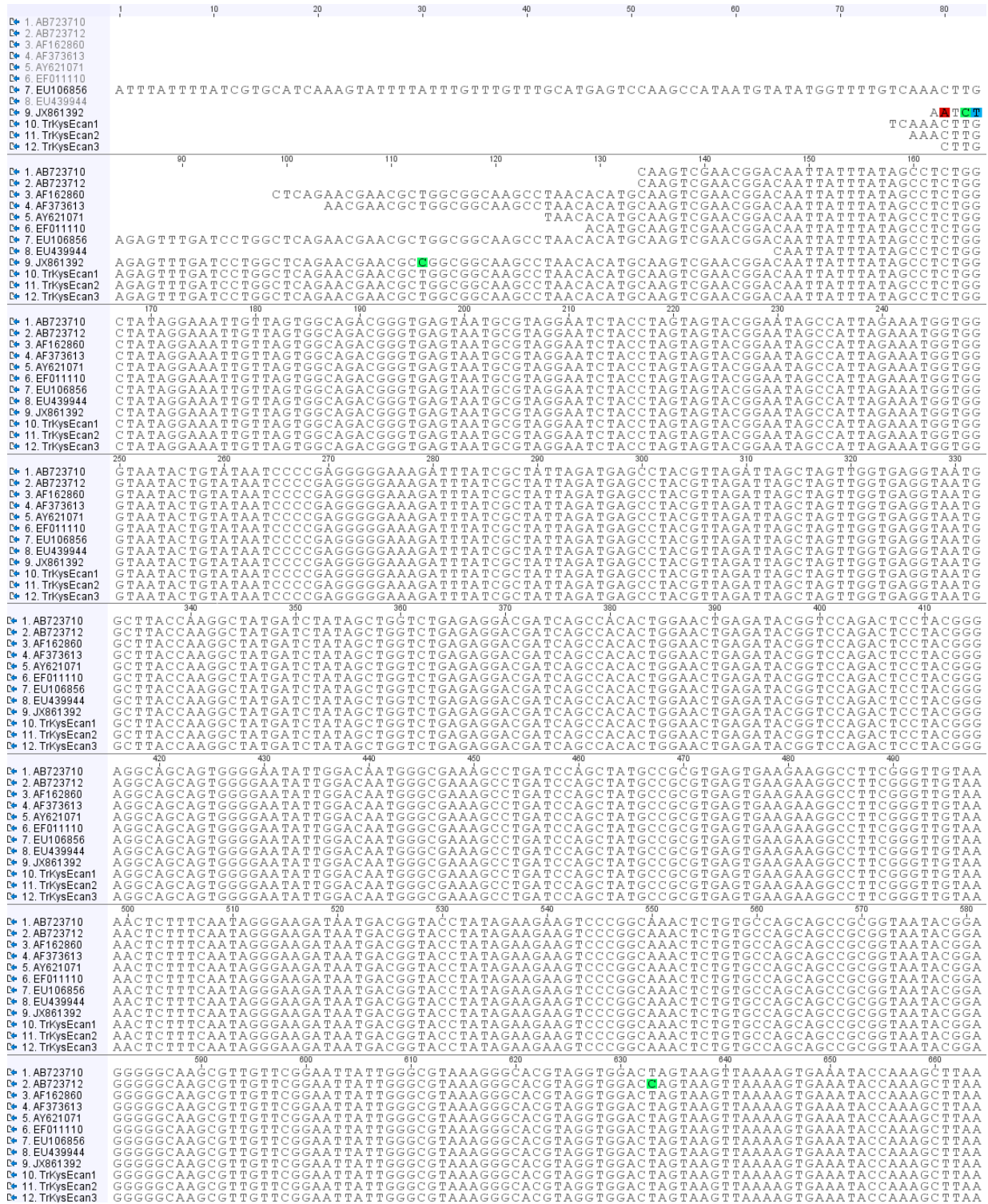
Tablo 4.14. *E. canis* yönünden multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları

İzolat/Aksesyon	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)	Toplam nükleotid sayısı
AB723710	23,6	19,9	27,8	28,8	51,4	48,6	1369,0
AB723712	23,5	19,9	27,8	28,8	51,3	48,7	1369,0
AF162860	23,7	19,9	27,6	28,9	51,2	48,8	1483,0
AF373613	23,4	20,0	28,0	28,6	51,3	48,7	1408,0
AY621071	23,8	19,6	27,9	28,8	51,6	48,4	1410,0
EF011110	23,6	19,9	27,8	28,6	51,5	48,5	1379,0
EU106856	25,8	19,2	27,2	27,8	53,0	47,0	1623,0
EU439944	24,0	19,6	27,6	28,9	51,5	48,5	1386,0
JX861392	23,6	19,8	27,8	28,8	51,4	48,6	1478,0
TrKysEcan1	23,8	19,8	27,6	28,8	51,4	48,6	1513,0
TrKysEcan2	23,8	19,8	27,6	28,8	51,4	48,6	1508,0
TrKysEcan3	23,8	19,8	27,5	28,9	51,3	48,7	1507,0
Ortalama	23,9	19,8	27,7	28,7	51,5	48,5	1452,8

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	AB723710											
2	AB723712	0,002										
3	AF162860	0,003	0,004									
4	AF373613	0,002	0,003	0,001								
5	AY621071	0,002	0,003	0,001	0,000							
6	EF011110	0,002	0,003	0,001	0,000	0,000						
7	EU106856	0,002	0,003	0,001	0,000	0,000	0,000					
8	EU439944	0,002	0,003	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000				
9	JX861392	0,002	0,003	0,006	0,001	0,000	0,000	0,007	0,000			
10	TrKysEcan1	0,002	0,003	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007		
11	TrKysEcan2	0,002	0,003	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	
12	TrKysEcan3	0,002	0,003	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000

Şekil 4.31. *E. canis* izolatlarının ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların 16S rRNA gen dizilimlerinin pairwise analizleri

Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *E. canis* izolatları ile Dünya'da GenBank'a kayıtlı benzer diğer bazı izolatların, parsiyel 16S rRNA gen bölgelerinin multible alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.32'de gösterilmiştir.

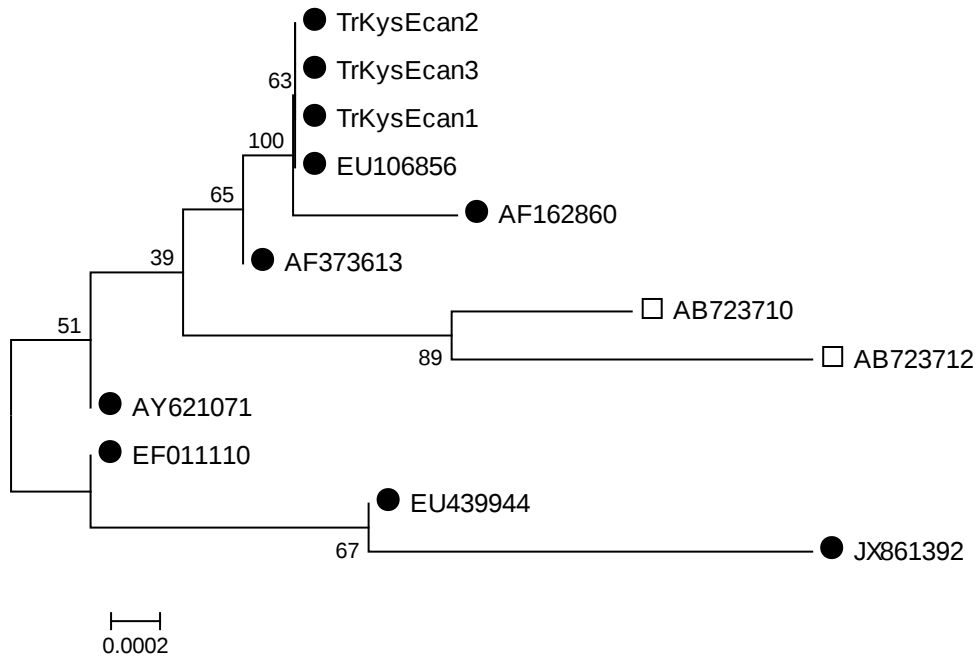


	1,330	1,340	1,350	1,360	1,370	1,380	1,390	1,400	1,410
1. AB723710	AAAGTTGTC	TCAGTTTC	CGGATTG	TCTCTG	AAACTC	CGAGAGCAT	GAAAGTC	CGGAATC	GCTAGTAA
2. AB723712	AAAGTTGTC	TCAGTTTC	CGGATTG	TCTCTG	AAACTC	CGAGAGCAT	GAAAGTC	CGGAATC	GCTAGTAA
3. AF162860	AAAGTTGTC	TCAGTTTC	CGGATTG	TCTCTG	AAACTC	CGAGAGCAT	GAAAGTC	CGGAATC	GCTAGTAA
4. AF373613	AAAGTTGTC	TCAGTTTC	CGGATTG	TCTCTG	AAACTC	CGAGAGCAT	GAAAGTC	CGGAATC	GCTAGTAA
5. AY621071	AAAGTTGTC	TCAGTTTC	CGGATTG	TCTCTG	AAACTC	CGAGAGCAT	GAAAGTC	CGGAATC	GCTAGTAA
6. EF011110	AAAGTTGTC	TCAGTTTC	CGGATTG	TCTCTG	AAACTC	CGAGAGCAT	GAAAGTC	CGGAATC	GCTAGTAA
7. EU106856	AAAGTTGTC	TCAGTTTC	CGGATTG	TCTCTG	AAACTC	CGAGAGCAT	GAAAGTC	CGGAATC	GCTAGTAA
8. EU439944	AAAGTTGTC	TCAGTTTC	CGGATTG	TCTCTG	AAACTC	CGAGAGCAT	GAAAGTC	CGGAATC	GCTAGTAA
9. JX861392	AAAGTTGTC	TCAGTTTC	CGGATTG	TCTCTG	AAACTC	CGAGAGCAT	GAAAGTC	CGGAATC	GCTAGTAA
10. TrKysEcan1	AAAGTTGTC	TCAGTTTC	CGGATTG	TCTCTG	AAACTC	CGAGAGCAT	GAAAGTC	CGGAATC	GCTAGTAA
11. TrKysEcan2	AAAGTTGTC	TCAGTTTC	CGGATTG	TCTCTG	AAACTC	CGAGAGCAT	GAAAGTC	CGGAATC	GCTAGTAA
12. TrKysEcan3	AAAGTTGTC	TCAGTTTC	CGGATTG	TCTCTG	AAACTC	CGAGAGCAT	GAAAGTC	CGGAATC	GCTAGTAA
	1,420	1,430	1,440	1,450	1,460	1,470	1,480	1,490	1,500
1. AB723710	GTGAATACG	TTCGCGG	TCTTGT	TACACAC	TGCCCG	TACGCC	CCATGGG	AATTGG	GCTTAA
2. AB723712	GTGAATACG	TTCGCGG	TCTTGT	TACACAC	TGCCCG	TACGCC	CCATGGG	AATTGG	GCTTAA
3. AF162860	GTGAATACG	TTCGCGG	TCTTGT	TACACAC	TGCCCG	TACGCC	CCATGGG	AATTGG	GCTTAA
4. AF373613	GTGAATACG	TTCGCGG	TCTTGT	TACACAC	TGCCCG	TACGCC	CCATGGG	AATTGG	GCTTAA
5. AY621071	GTGAATACG	TTCGCGG	TCTTGT	TACACAC	TGCCCG	TACGCC	CCATGGG	AATTGG	GCTTAA
6. EF011110	GTGAATACG	TTCGCGG	TCTTGT	TACACAC	TGCCCG	TACGCC	CCATGGG	AATTGG	GCTTAA
7. EU106856	GTGAATACG	TTCGCGG	TCTTGT	TACACAC	TGCCCG	TACGCC	CCATGGG	AATTGG	GCTTAA
8. EU439944	GTGAATACG	TTCGCGG	TCTTGT	TACACAC	TGCCCG	TACGCC	CCATGGG	AATTGG	GCTTAA
9. JX861392	GTGAATACG	TTCGCGG	TCTTGT	TACACAC	TGCCCG	TACGCC	CCATGGG	AATTGG	GCTTAA
10. TrKysEcan1	GTGAATACG	TTCGCGG	TCTTGT	TACACAC	TGCCCG	TACGCC	CCATGGG	AATTGG	GCTTAA
11. TrKysEcan2	GTGAATACG	TTCGCGG	TCTTGT	TACACAC	TGCCCG	TACGCC	CCATGGG	AATTGG	GCTTAA
12. TrKysEcan3	GTGAATACG	TTCGCGG	TCTTGT	TACACAC	TGCCCG	TACGCC	CCATGGG	AATTGG	GCTTAA
	1,500	1,510	1,520	1,530	1,540	1,550	1,560	1,570	1,580
1. AB723710	GGAAGCAG								
2. AB723712	GGAAGCAG								
3. AF162860	GGAAGCAGCCATTTAAGGTTGGGTTAGTGACTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTTGAACCTGCGGCTGGATTACC								
4. AF373613	GGAAGCAGCCATTTAAGGTTGGGTTAGTGACTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTTGAACCTGCGGCTGGATTACC								
5. AY621071	GGAAGCAGCCATTTAAGGTTGGGTTAGTGACTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTTGAACCTGCGGCTGGATTACC								
6. EF011110	GGAAGCAGCCATTTAAGGTTGGGTTAGTGACTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTTGAACCTGCGGCTGGATTACC								
7. EU106856	GGAAGCAGCCATTTAAGGTTGGGTTAGTGACTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTTGAACCTGCGGCTGGATTACC								
8. EU439944	GGAAGCAGCCATTTAAGGTTGGGTTAGTGACTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTTGAACCTGCGGCTGGATTACC								
9. JX861392	GGAAGCAGCCATTTAAGGTTGGGTTAGTGACTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTTGAACCTGCGGCTGGATTACC								
10. TrKysEcan1	GGAAGCAGCCATTTAAGGTTGGGTTAGTGACTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTTGAACCTGCGGCTGGATTACC								
11. TrKysEcan2	GGAAGCAGCCATTTAAGGTTGGGTTAGTGACTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTTGAACCTGCGGCTGGATTACC								
12. TrKysEcan3	GGAAGCAGCCATTTAAGGTTGGGTTAGTGACTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTTGAACCTGCGGCTGGATTACC								
	1,580	1,590	1,600	1,610	1,620	1,630	1,640	1,650	1,660
1. AB723710	TCCTT								
2. AB723712	TCCTT								
3. AF162860	TCCTTTTAGGCTTTCTTATCGTATATTATTTTTTAGTAAATGTTTTT								
4. AF373613	TCCTTTTAGGCTTTCTTATCGTATATTATTTTTTAGTAAATGTTTTT								
5. AY621071	TCCTTTTAGGCTTTCTTATCGTATATTATTTTTTAGTAAATGTTTTT								
6. EF011110	TCCTTTTAGGCTTTCTTATCGTATATTATTTTTTAGTAAATGTTTTT								
7. EU106856	TCCTTTTAGGCTTTCTTATCGTATATTATTTTTTAGTAAATGTTTTT								
8. EU439944	TCCTTTTAGGCTTTCTTATCGTATATTATTTTTTAGTAAATGTTTTT								
9. JX861392	TCCTTTTAGGCTTTCTTATCGTATATTATTTTTTAGTAAATGTTTTT								
10. TrKysEcan1	TCCTTTTAGGCTTTCTTATCGTATATTATTTTTTAGTAAATGTTTTT								
11. TrKysEcan2	TCCTTTTAGGCTTTCTTATCGTATATTATTTTTTAGTAAATGTTTTT								
12. TrKysEcan3	TCCTTTTAGGCTTTCTTATCGTATATTATTTTTTAGTAAATGTTTTT								

Şekil 4.32. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen *E. canis* izolatları ile Dünyadaki diğer bazı *E. canis* izolatlarının parsiyel 16S rRNA gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları

Şekil 4.32’de görüldüğü gibi 16S rRNA gen bölgesine göre saptanan *E. canis* izolatları arasında nükleotid farklılıklarının oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *E. canis* izolatlarının pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında %100 identik oldukları, dünyadan alignmentta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında ise ortalama %0,1, farklılık bulunduğu tespit edilmiştir.

Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *E. canis* izolatları ile Dünyadan benzer diğer bazı izolatların Neighbor Joining Metodu (Kimura 2 Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.33’de verilmiştir. Filogenetik ağaçta da görüleceği üzere saptanan izolatların Tayvan ve Çin’de köpeklerden izole edilmiş TWN1 ve Gzh982 izolatlarıyla aynı filogenik grupta yer aldığı görülmüştür.



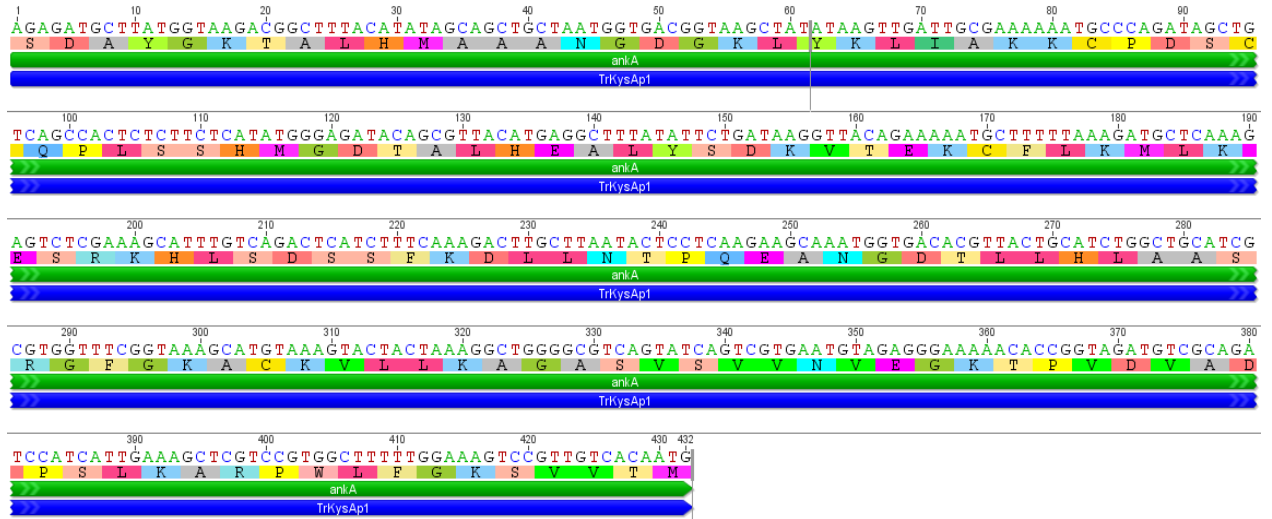
Şekil 4.33. Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *E. canis* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların 16S rRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining - Kimura 2 Parametre modeli). Semboller; □ : Vahşi kedi, ● : Köpek

4.3.3. *Anaplasma phagocytophilum*'ün Ankryin (ankA) Geninin Sekans ve Filogenetik Analiz Sonuçları

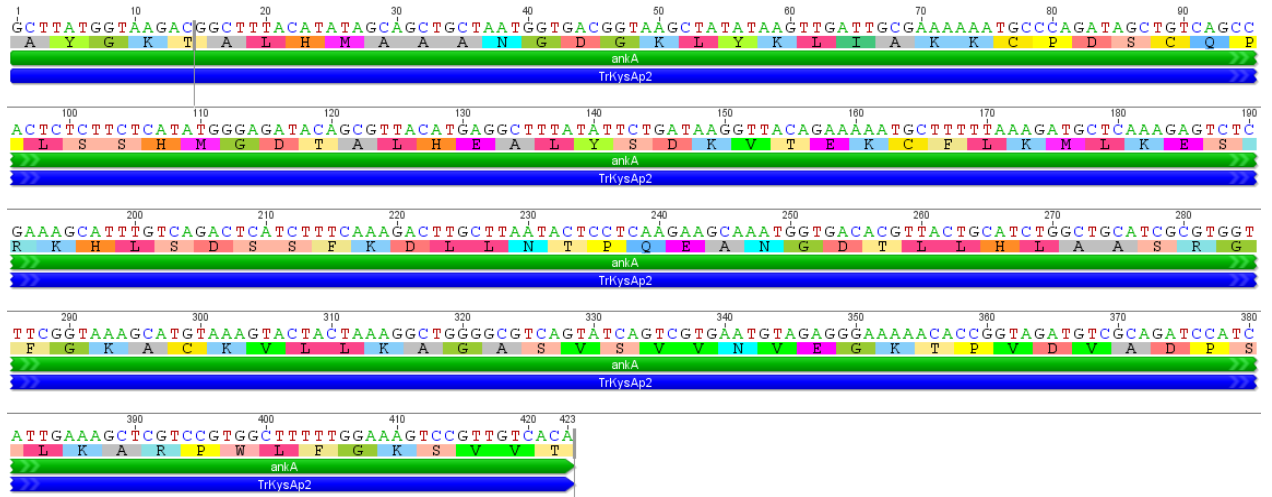
Real Time PCR analizlerinde *A. phagocytophilum* yönünden pozitif belirlenen, jelde görüntü veren ve spektrofotometrik olarak uygun konsantrasyonda belirlenen izolatlardan 3'ünün sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Ankryin (ankA) geni yönünden *A. phagocytophilum* izolatlarına ait DNA dizileri, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler olarak karakterize edilen tür dağılımı Tablo 4.15'de, nükleotid ve amino asit kompozisyonları ise Şekil 4.34-4.36'da verilmiştir.

Tablo 4.15. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen *Anaplasma* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler

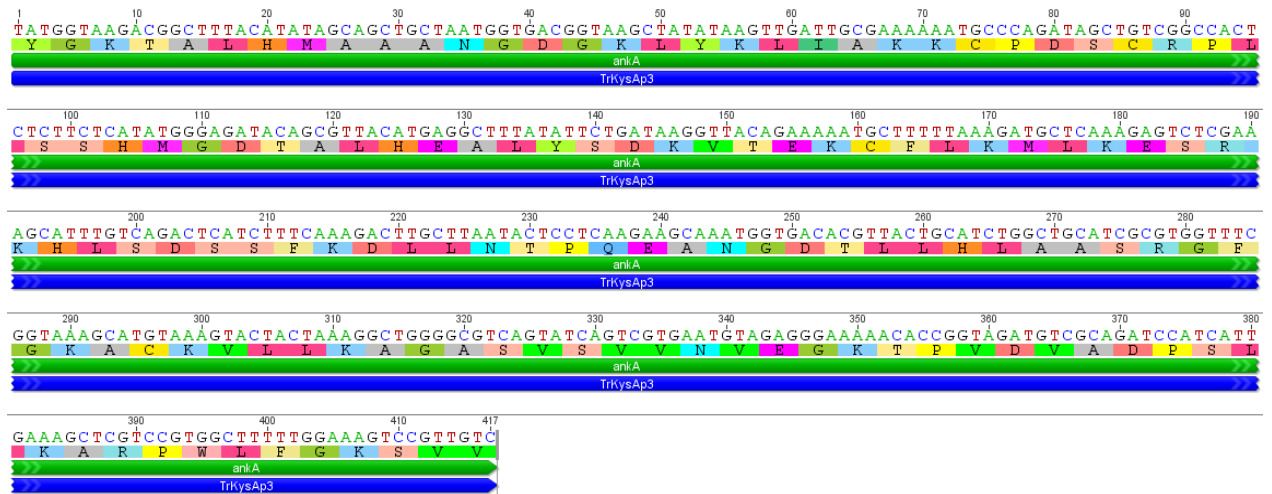
İzolat	Gen bölgesi	Konak ve izolasyon kaynağı	<i>Anaplasma</i> türü	Toplam Nükleotid Sayısı
TrKysAp1	ankA	Köpek/ kan	<i>A. phagocytophilum</i>	432
TrKysAp2	ankA	Köpek/ kan	<i>A. phagocytophilum</i>	423
TrKysAp3	ankA	Köpek/ kan	<i>A. phagocytophilum</i>	417



Şekil 4.34. *A. phagocytophilum* TrKysAp1 izolatının nükleotid ve amino aist dizilimleri



Şekil 4.35 *A. phagocytophilum* TrKysAp2 izolatının nükleotid ve amino aist dizilimleri



Şekil 4.36. *A. phagocytophilum* TrKysAp3 izolatının nükleotid ve amino aist dizilimleri

Araştırma yöresinde köpeklerden elde edilen *A. phagocytophilum* izolatlarıyla ankA gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan Dünya'daki diğer bazı *Anaplasma* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank'tan alınarak Tablo 4.16'da gösterilmiştir.

Tablo 4.16. Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer *Anaplasma* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

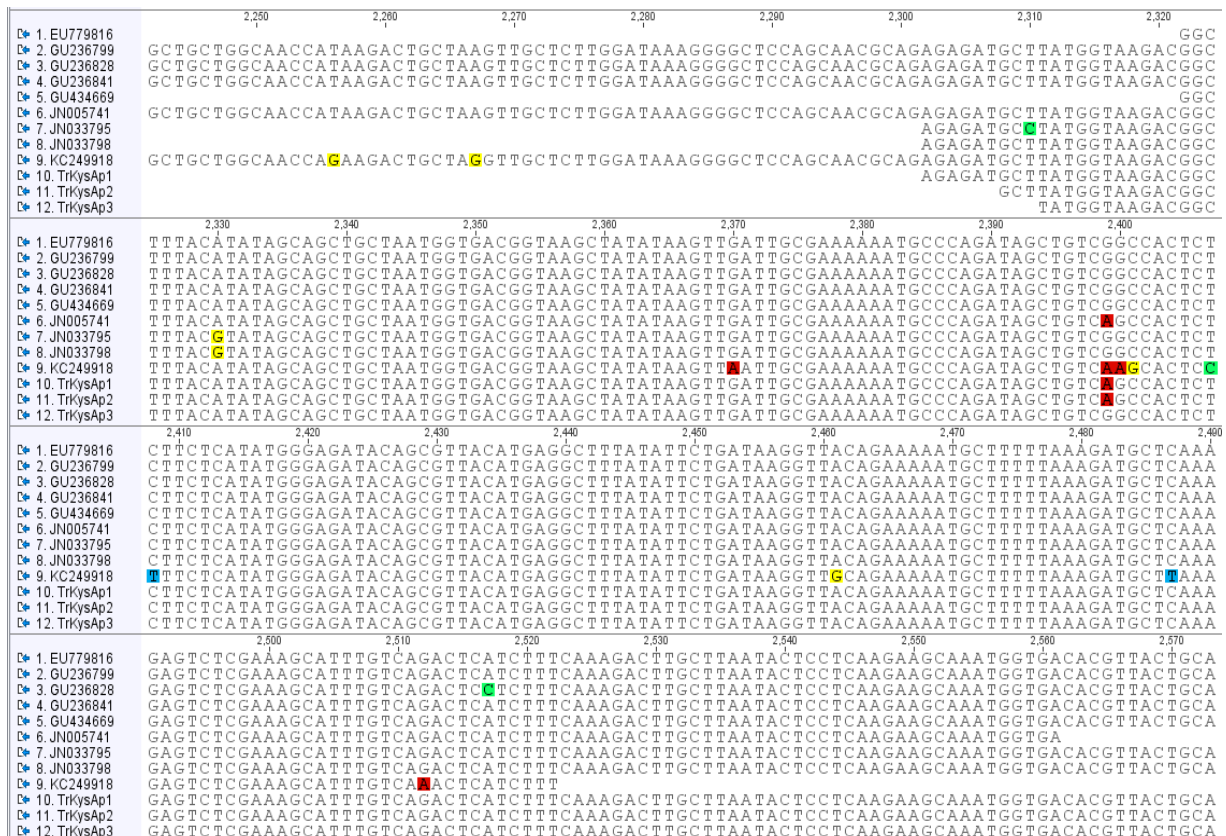
İzolat	Orijin	İzolasyon kaynağı	Türler	Aksesyon Numarası
strain 213	Polonya	Kene	<i>A. phagocytophilum</i>	EU779816
sheep_6054	Norveç	Koyun	<i>A. phagocytophilum</i>	GU236799
dog_18	Almanya	Köpek	<i>A. phagocytophilum</i>	GU236828
dog_34	Almanya	Köpek	<i>A. phagocytophilum</i>	GU236841
450-7	Polonya	Yaban domuzu	<i>A. phagocytophilum</i>	GU434669
PZA-2	Polonya	Vahşi ruminant	<i>A. phagocytophilum</i>	JN005741
10	Ürdün	Köpek	<i>A. phagocytophilum</i>	JN033795
31	Ürdün	Köpek	<i>A. phagocytophilum</i>	JN033798
Ip_252_SPT	ABD	Kene	<i>A. phagocytophilum</i>	KC249918

Kayseri yöresinde köpeklerde *A. phagocytophilum* yönünden pozitif belirlenen ve nükleotid dizisi ortaya konan izolatlar ile Dünyanın çeşitli ülkelerinden multiple alignmentta dahil edilen diğer izolatların ankA gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Tablo 4.17'de, pairwise alignmentları ise Şekil 4.37'de verilmiştir.

Tablo 4.17. *A. phagocytophilum* yönünden multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları

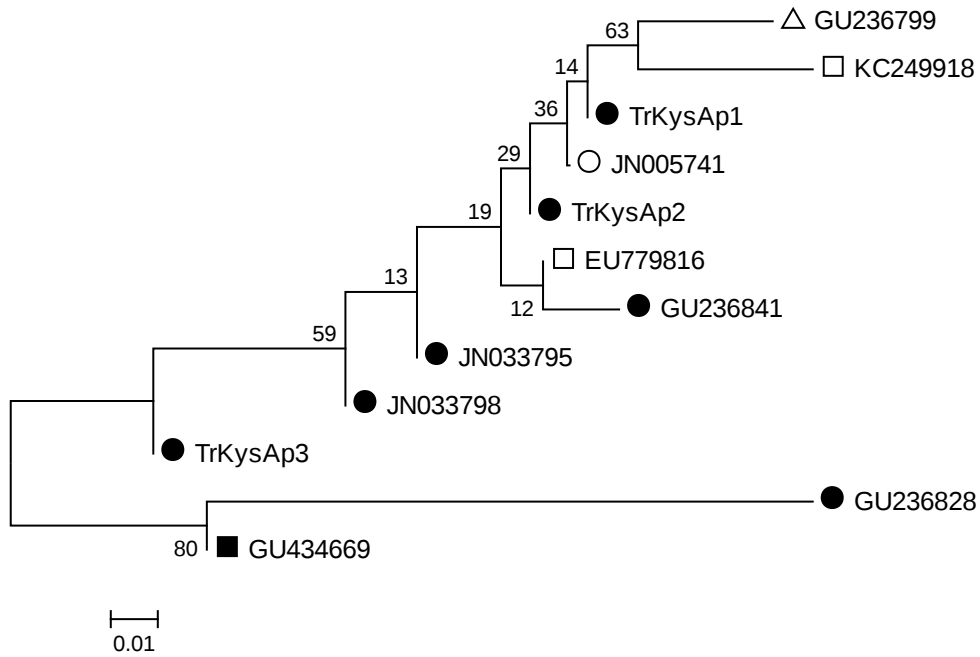
İzolat/Aksesyon	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)	Toplam nükleotid sayısı
EU779816	28,3	18,9	29,0	23,8	57,3	42,7	403,0
GU236799	25,4	18,8	30,2	25,6	55,6	44,4	3717,0
GU236828	25,5	18,9	30,4	25,1	56,0	44,0	3696,0
GU236841	25,5	18,9	30,5	25,1	55,9	44,1	3621,0
GU434669	28,3	18,9	29,0	23,8	57,3	42,7	403,0
JN005741	26,7	19,4	30,3	23,5	57,1	42,9	617,0
JN033795	27,5	19,0	29,2	24,3	56,7	43,3	432,0
JN033798	27,8	18,8	29,2	24,3	56,9	43,1	432,0
KC249918	27,2	19,0	29,5	24,3	56,6	43,4	567,0
TrKysAp1	27,8	18,8	29,6	23,8	57,4	42,6	432,0
TrKysAp2	27,9	19,1	29,3	23,6	57,2	42,8	423,0
TrKysAp3	28,1	18,9	29,0	24,0	57,1	42,9	417,0
Ortalama	26,1	18,9	30,1	24,9	56,2	43,8	1263,3

Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *A. phagocytophilum* izolatları ile Dünya'da GenBank'a kayıtlı benzer diğer bazı izolatların, parsiyel ankA gen bölgelerinin multiple alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.38'de gösterilmiştir.



Şekil 4.38’de görüldüğü gibi ankA gen bölgesine göre saptanan *A. phagocytophilum* izolatları arasında çeşitli nükleotid farklılıkları belirlenmiştir. Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *A. phagocytophilum* izolatlarının pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında $99,8 \pm 0,2$ identik oldukları, dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında ise ortalama $90,9 \pm 0,3$ farklılık bulunduğu tespit edilmiştir.

Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *A. phagocytophilum* izolatları ile Dünyadan benzer diğer bazı izolatların Neighbor Joining Metodu (Kimura 2 Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.39’da verilmiştir. Filogenetik ağaçta da görüleceği üzere TrKysAp1 ve TrKysAp2 izolatlarının Polonya’da vahşi ruminanttan izole edilen PZA-2 izolatı (JN005741), TrKysAp3 izolatının ise Almanya’da köpekten, Polonya’da yaban domuzundan ve Ürdün’den köpeklerden izole edilen sırasıyla dog_34 (GU236841), 450-7 (GU434669), 10 (JN033795) ve 31 (JN033798) izolatlarıyla filogenik olarak en yüksek identikliği göstermiştir.



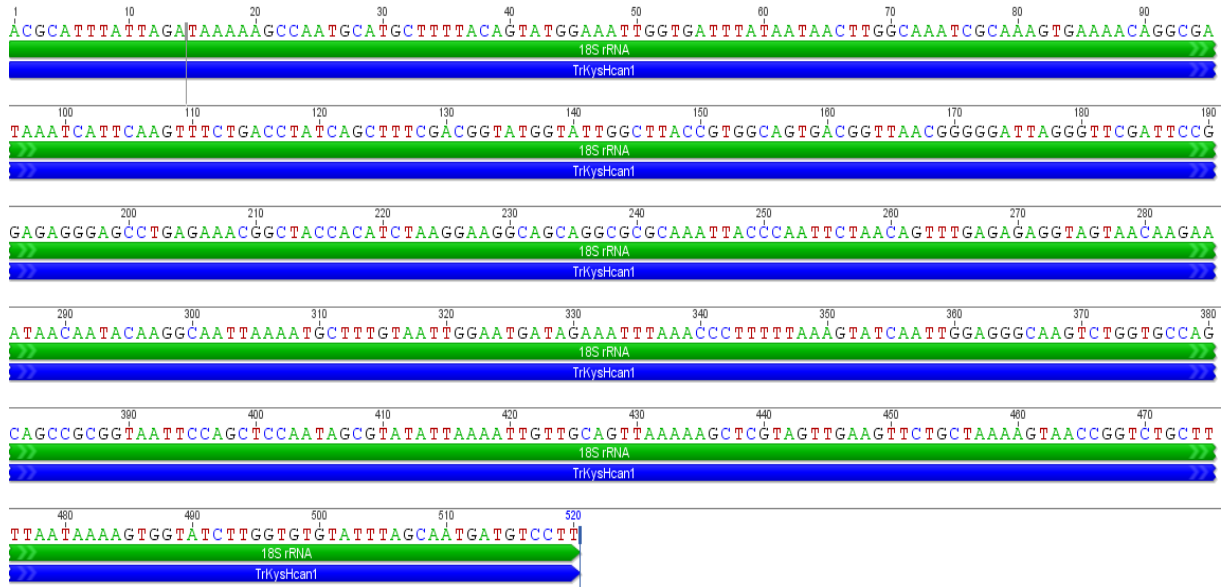
Şekil 4.39. Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *A. phagocytophilum* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların ankA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter modeli). Semboller; □ : Kene, ● : Köpek, ○ : Vahşi ruminant, △ : Koyun, ■ : Yaban domuzu

4.3.4. *Hepatozoon canis*'in 18S rRNA Geninin Sekans ve Filogenetik Analiz Sonuçları

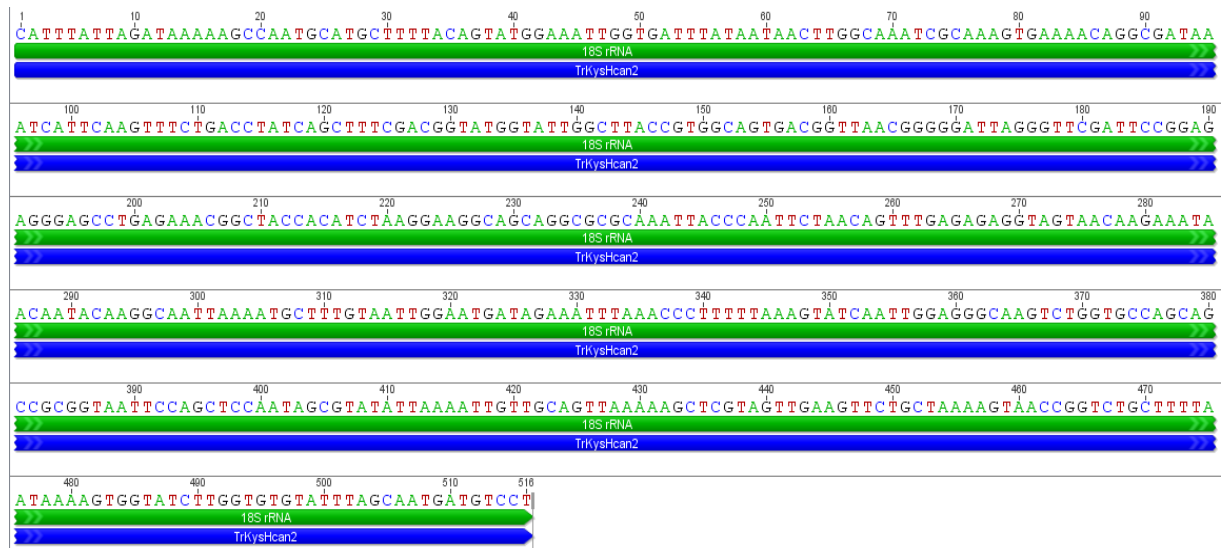
Real Time PCR analizlerinde *H. canis* yönünden pozitif belirlenen, jelde görüntü veren ve spektrofotometrik olarak uygun konsantrasyonda belirlenen izolatlardan 2'sinin sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. 18S rRNA geni yönünden *H. canis* izolatlarına ait DNA dizileri, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler olarak karakterize edilen tür dağılımı Tablo 4.18'de, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.40 ve Şekil 4.41'de verilmiştir.

Tablo 4.18. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen *Hepatozoon* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler

İzolat	Gen bölgesi	Konak ve izolasyon kaynağı	<i>Hepatozoon</i> türü	Toplam Nükleotid Sayısı
TrKysHcan1	18S rRNA	Köpek/ kan	<i>H. canis</i>	520
TrKysHcan2	18S rRNA	Köpek/ kan	<i>H. canis</i>	516



Şekil 4.40. *H. canis* TrKysHcan1 izolatının nükleotid dizilimi



Şekil 4.41. *H. canis* TrKysHcan2 izolatının nükleotid dizilimi

Araştırma yöresinde köpeklerden elde edilen *H. canis* izolatlarıyla 18S rRNA gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan Dünya'daki diğer bazı *Hepatozoon* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank'tan alınarak Tablo 4.19'da gösterilmiştir.

Tablo 4.19. Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer *Hepatozoon* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	Orijin	İzolasyon kaynağı	Türler	Aksesyon Numarası
Bodrum	Türkiye	Köpek	<i>H. canis</i>	DQ060327
Aydın	Türkiye	Köpek	<i>H. canis</i>	DQ060328
Selcuk	Türkiye	Köpek	<i>H. canis</i>	DQ060329

37	Ürdün	Köpek	<i>H. canis</i>	JF827605
dog-1	Kolombiya	Köpek	<i>H. canis</i>	JN217101
dog-2	Kolombiya	Köpek	<i>H. canis</i>	JN217102
DD11	Türkiye	Kene	<i>H. canis</i>	JQ867389
DD11	Türkiye	Köpek	<i>H. canis</i>	JQ867390
ZA04	Nijerya	Köpek	<i>H. canis</i>	JQ976622

Kayseri yöresinde köpeklerde *H. canis* yönünden pozitif belirlenen ve nükleotid dizisi ortaya konan izolatlar ile Dünyanın çeşitli ülkelerinden multiple alignmentta dahil edilen diğer izolatların 18S rRNA gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Tablo 4.20'de, pairwise alignmentları ise Şekil 4.42'de verilmiştir.

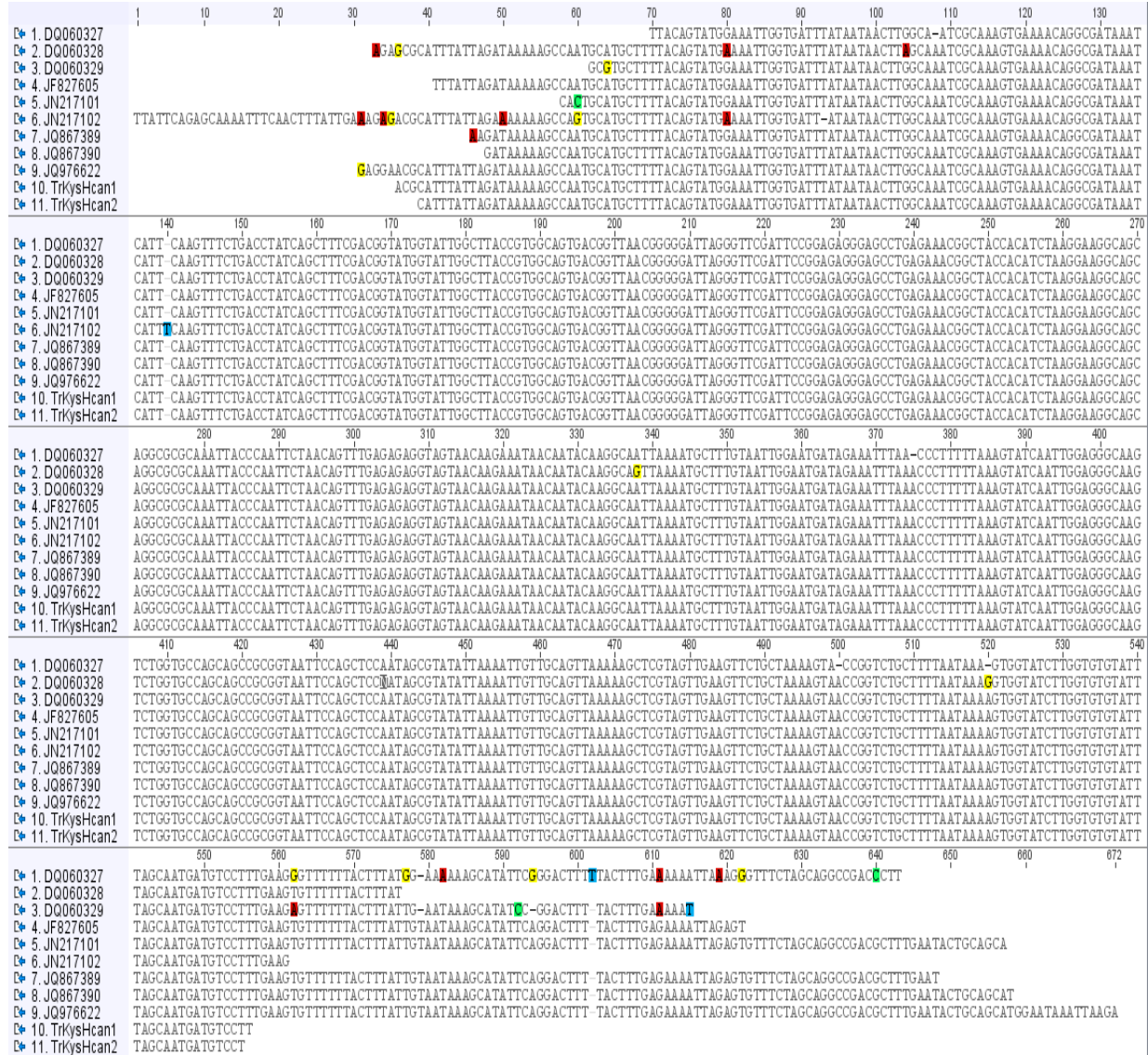
Tablo 4.20. *H. canis* yönünden multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları

İzolat/Aksesyon	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)	Toplam nükleotid sayısı
DQ060327	29,0	16,0	31,2	23,8	60,2	39,8	568,0
DQ060328	29,0	15,9	31,7	23,4	60,7	39,3	542,0
DQ060329	29,3	15,8	31,6	23,3	60,9	39,1	550,0
JF827605	29,8	15,2	32,2	22,8	62,1	37,9	580,0
JN217101	29,4	16,2	31,1	23,2	60,5	39,5	598,0
JN217102	28,0	15,9	33,0	23,0	61,1	38,9	560,0
JQ867389	29,3	15,6	31,9	23,1	61,2	38,8	601,0
JQ867390	29,2	15,9	31,7	23,2	60,9	39,1	609,0
JQ976622	29,1	15,5	32,3	23,1	61,4	38,6	640,0
TrKysHcan1	27,9	16,3	32,3	23,5	60,2	39,8	520,0
TrKysHcan2	27,9	16,3	32,4	23,4	60,3	39,7	516,0
Ortalama	28,9	15,9	32,0	23,2	60,9	39,1	571,3

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	DQ060327										
2	DQ060328	0,008									
3	DQ060329	0,009	0,012								
4	JF827605	0,013	0,008	0,013							
5	JN217101	0,014	0,010	0,013	0,002						
6	JN217102	0,002	0,010	0,004	0,006	0,004					
7	JQ867389	0,014	0,010	0,013	0,002	0,002	0,008				
8	JQ867390	0,014	0,008	0,013	0,000	0,002	0,006	0,000			
9	JQ976622	0,014	0,011	0,013	0,000	0,002	0,011	0,002	0,000		
10	TrKysHcan1	0,000	0,008	0,002	0,000	0,002	0,006	0,002	0,000	0,000	
11	TrKysHcan2	0,000	0,008	0,002	0,000	0,002	0,006	0,002	0,000	0,000	0,000

Şekil 4.42. *H. canis* izolatlarının ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların 18S rRNA gen dizilimlerinin pairwise analizleri

Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *H. canis* izolatları ile Dünya'da GenBank'a kayıtlı benzer diğer bazı izolatların, parsiyel 18S rRNA gen bölgelerinin multiple alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.43'de gösterilmiştir.

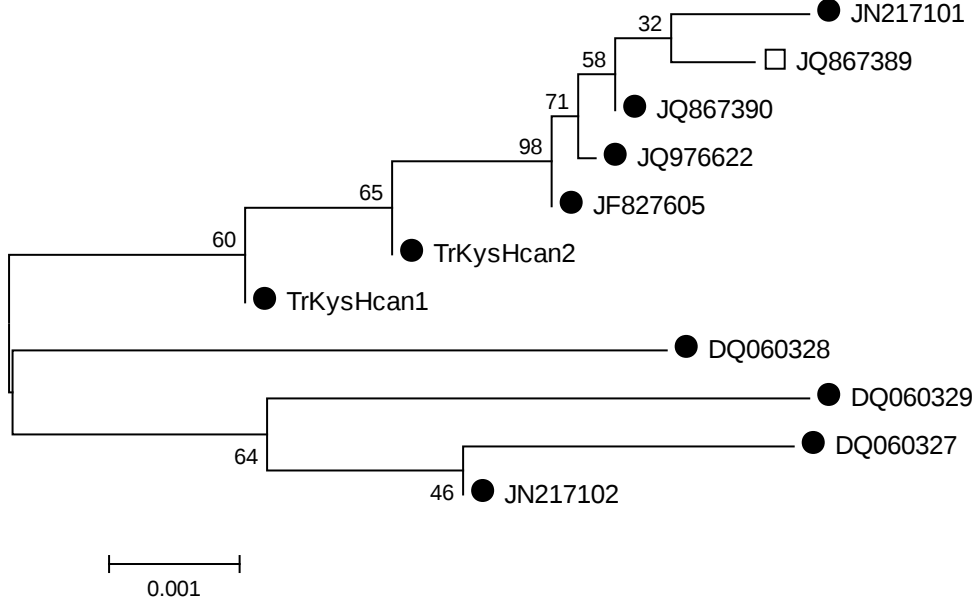


Şekil 4.43. Kayseri yöresinde köpeklerde belirlenen *H. canis* izolatları ile Dünyadaki diğer bazı *H. canis* izolatlarının parsiyel 18S rRNA gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları

Şekil 4.43'de görüldüğü gibi 18S rRNA gen bölgesine göre saptanan *H. canis* izolatları arasında çeşitli nükleotid farklılıkları belirlenmiştir. Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *H. canis* izolatlarının pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında %100 identik oldukları, dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında ise ortalama $0,2 \pm 0,1$ farklılık bulunduğu tespit edilmiştir.

Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *H. canis* izolatları ile Dünyadan benzer diğer bazı izolatların Neighbor Joining Metodu (Kimura 2 Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik

ağacı Şekil 4.44’de verilmiştir. Filogenetik ağaçta da görüleceği üzere TrKysHcan1 ve TrKysHcan2 izolatlarının Ürdün’de köpekten, Türkiye’de ise köpeklerden izole edilen sırasıyla 37, DD11 ve Bodrum izolatlarıyla filogenik olarak %100 identik olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.44. Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *H. canis* izolatları ile GenBank’a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların ankA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter modeli). Semboller; □ : Kene, ● : Köpek

TARTIŞMA VE SONUÇ

Vektör-borne (babesiosis, hepatozoonosis, anaplasmosis, ehrlichiosis) ve food-borne (toxoplasmosis ve neosporosis) protozoon enfeksiyonları tüm dünyada hem insan hem de hayvan sağlığını tehdit etmektedirler. Söz konusu enfeksiyonlar köpeklerde klinik ve subklinik seyir gösterirler. Köpekler bu enfeksiyözler için aynı zamanda iyi bir rezervuardırlar. Uluslararası turizm ve seyahat aktivitelerinin global ölçekte artması, insanların özellikle tatil amaçlı seyahatlerde de köpeklerinden ayrılmak istememeleri, iklim ve ekolojik değişiklikler gibi bir çok faktör bu enfeksiyonların kıtalar, ülkeler veya bölgeler arasında hızlı bir şekilde yayılmasına neden olmaktadır.

Canine Babesiosis: Köpeklerde babesiosis ixodid keneler tarafından nakledilen ve *Babesia canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. canis rossi* gibi büyük *Babesia* türleri ile *Babesia gibsoni*, *B. conradae* ve *B. microti*-benzeri tür (*Theileria annae* veya “Spanish dog isolate”) gibi küçük *Babesia* türleri tarafından oluşturulan bir enfeksiyondur (101). Bu parazitler köpeklerin eritrositlerini enfekte eder ve hemolytic anemiye yol açarlar. *B. gibsoni* büyük *Babesia* türlerinden daha ağır klinik tabloya yol açar ve genellikle multiple organ disfonksiyon sendromu ile sonuçlanabilir (102). Büyük ve küçük *Babesia* türleri mikroskopik olarak kolay ayırt edilebilmesine karşın (8, 101) morfolojik tabanlı teşhis tür identifikasyonunda yetersiz kalmaktadır (11, 103, 104). Moleküler tabanlı birçok teknik günümüzde her tür patojenin genetik karakterizasyonu için alternatif araçlar olarak kullanılmaktadır (105). Bunlar arasında SSU rRNA geninin filogenetik analizi *B. canis* ve *B. gibsoni* üzerine moleküler çalışmalarda yaygın olarak uygulanmıştır (3, 64, 106, 107, 108). Bu teknik aynı zamanda köpeklerde genotipik olarak farklı İspanya’da *Theileria annae* (109, 110), Kaliforniya’da *Babesia conradae* (11) gibi küçük piroplazmlar ve Kuzey Amerika’da büyük *Babesia* sp. (13) gibi yeni türlerin tanımlanmasında da başarı ile kullanılmıştır. Ayrıca PCR- RFLP tekniği *B. canis canis* ve *B. canis vogeli* saha izolatlarının karakterize edilmelerinde kullanılabileceği rapor edilmiştir (111, 112). *B. gibsoni* ve *B. canis canis*’in tür spesifik teşhisinde konvansiyonel PCR yönteminin güvenilir alternatif bir yöntem olduğu kaydedilmiştir (113, 114, 115, 116). Birkenheuer ve ark. (117), *B. gibsoni*, *B. c. canis*, *B. c. vogeli* veya *B. c. rossi*’nin teşhisinde semi nested PCR yöntemini oldukça duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Duarte ve ark. (118) tarafından 18S rRNA gen bölgesinden dizayn edilen tür spesifik primerlerle uygulanan tek

basamak PCR yöntemi ile *B. c. canis*, *B. c. vogeli* ve *B. c. rossi*'nin identifiye edilebildiği ortaya konmuştur.

Real Time PCR tekniği sahip olduğu yüksek sensitivite, bir örnekteki mevcut spesifik DNA'nın başarılı ve tekrarlanabilir olarak ölçülebilmesi gibi çeşitli avantajlarıyla son yıllarda bir çok patojenin spesifik teşhisinde ve takibinde konvansiyonel PCR, Nested PCR ve sekans tekniklerinin yerini almaya başlamıştır (19, 119, 120). Mevcut literatürde köpeklerde babesiosis'in Real Time PCR ile teşhisine yönelik çok sınırlı veri bulunmaktadır. Schaarschmidt ve ark. (121) bu tekniği sadece köpeklerdeki paraziter enfeksiyonu göstermek amacıyla kullanmışlardır. Diğer yandan Matsuu ve ark. (119), köpeklerden izole edilmiş *B. gibsoni* DNA'sının kantitatif analizinde SYBR Green tabanlı Real-Time PCR tekniğini uygulamışlardır. Adaszek ve Winiarczyk (122), *B. canis canis*'in spesifik teşhisinde 18S RNA gen bölgesinden dizayn edilen primerlerle Real-Time PCR- high-resolution melting (HRM) tekniğini uygulamışlar, genetik olarak iki farklı *B. canis canis* izolatlarını gruplandırmışlar ve bu grupların melting curve analizlerine göre ayrılabilceğini belirlemişlerdir. Costa-Junior ve ark. (120), ribozomal internal transcribed spacer (ITS) gen bölgesinden dizayn ettikleri primer ve problemlerle uyguladıkları Taqman Real Time PCR tekniği ile *B. c. canis*, *B. c. vogeli* ve *B. c. rossi*'nin spesifik olarak identifikasyonu yapmışlardır. Ayrıca araştırmacılar (120) bu teknikle Brezilya'da 242 köpekten topladıkları kan örneklerinde yalnızca *B. c. vogeli*'yi %9,9 oranında tespit ettiklerini kaydetmişlerdir. Bu çalışmada köpeklerde *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. canis rossi* ve *B. gibsoni*'nin TaqMan prob tabanlı Real Time PCR ile identifikasyonu için heat shock protein 70 (HSP70) gen bölgesi hedef olarak seçilmiştir. HSP proteinleri farklı şekillerde hücresel stresin ortaya çıktığı durumlarda aktive olan ve biosentezlenen bir protein grubudur (108). Bu proteinler hücrelerin hayati fonksiyonlarının regülasyonunda görev almaktadır. Bu protein familyasının ana polipeptidlerinden birisi, diğerlerine göre en çok korunmuş ve en yaygın görülen HSP 70 proteindir. Bu proteini kodlayan HSP70 geni birçok *Babesia* türünde genetik olarak araştırılmıştır (123). HSP70 geni sahip olduğu yüksek düzeyde korunmuş bölgeleriyle moleküler filogenetik çalışmalarda hedef bir bölge olarak nitelenmektedir (123). Nitekim bu çalışmada söz konusu gen bölgesinden dizayn edilen türe özgü prob dizilerinin *B. canis canis*, *B. canis rossi* ve *B. gibsoni* için Real Time PCR analizlerinde spesifik reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Ancak *B. canis vogeli* probu'nun *B. canis canis* ve *B. gibsoni* ile de amplifikasyon verdiği belirlenmiştir. Real Time PCR analizlerinde *B. canis vogeli* pozitiflikleri diğer iki tür dışındaki sonuçlar göz önüne alınarak

verilmiştir. Ayrıca bu sonuçlar sekans analizleriyle de teyit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada *Babesia* türleri arasında *B. canis canis* %12,0 ile en yaygın tür belirlenmiş, bunu %9,0 ile *B. gibsoni* ve %2,3 ile *B. canis vogeli* takip etmiştir. İncelenen örneklerde *B. canis rossi*'ye ise rastlanmamıştır. Ayrıca 12 örnekte *B. gibsoni* + *B. canis canis* miks enfeksiyon tespit edilmiştir. Parazitemi açısından pozitif örneklerde *B. canis canis*, *B. canis vogeli* ve *B. gibsoni* için ortalama Ct (dR) değerleri de sırasıyla $32,2 \pm 0,8$, $31,6 \pm 2,2$, $33,4 \pm 0,9$ olarak bulunmuştur. Türkiye'de köpeklerde babesiosis üzerine moleküler çalışmaların oldukça sınırlıdır. Bunlardan, Aysul (65) İstanbul yöresinde 493 köpekten alınmış kan örneklerinden elde edilen genomik DNA ekstraktlarında PCR-RLB yöntemi ile %3,9 oranında *B. canis vogeli* pozitifliğini bildirmiştir. Gülanber ve ark. (64), İstanbul'da klinik şüpheli bir köpekten aldıkları kan örneklerinde PCR-RFLP tekniği ile *B. canis vogeli* enfeksiyonunu saptamışlardır. Muller ve ark. (124), Aydın yöresinden örneklenmiş 58 köpekte Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) ve RLB teknikleri ile yaptıkları çalışmada *B. canis vogeli*'yi LAMP tekniği ile 12 örnekte RLB ile ise 15 örnekte tespit etmişlerdir. Gökçe ve ark. (125), Kars yöresinde klinik olarak babesiosis şüpheli 3 köpekte konvansiyonel PCR ile *B. canis canis* tanısı koymuşlardır. Takiben Aydın'da klinik olarak şüpheli bir köpekte konvansiyonel PCR analizi ile *B. gibsoni* pozitifliği bildirilmiştir (126). Bu çalışmada *B. canis vogeli* için belirlenen moleküler prevalansın Aydın yöresinde yürütülmüş tez çalışmasında (65) RLB tekniği ile saptanan prevalans oranına yakın olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada Real Time PCR analizlerinde pozitif saptanan, jelde görüntü veren ve spektrofotometrik olarak uygun konsantrasyonda belirlenenlerden *B. canis canis* için 3 (TrKysBccan1, TrKysBccan2, TrKysBccan3), *B. canis vogeli* için 2 (TrKysBcvog1, TrKysBcvog2), *B. gibsoni* için de 3 (TrKysBgib1, TrKysBgib2, TrKysBgib3) izolatın 18S rRNA gen bölgesi yönünden sekans ve filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. *B. canis canis*, *B. canis vogeli* ve *B. gibsoni* belirlenen izolatların pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında ve dünyadan alignmentta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında sırasıyla ortalama $1,4 \pm 0,2$, $0,3 \pm 0,2$ ve $0,9 \pm 0,3$ farklılık saptanmıştır. Ayrıca *B. canis canis* ve *B. canis vogeli* grupları arasında $5,9 \pm 1,1$, *B. canis canis* ve *B. gibsoni* grupları arasında $14,1 \pm 1,7$ ve *B. canis vogeli* ve *B. gibsoni* grupları arasında ise $14,9 \pm 1,4$ oranında genetik farklılık belirlenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen *B. canis canis* TrKysBccan 1 ve TrKysBccan 3 izolatları, en yüksek identikliği %99,5 ile Macaristan'da bir köpekte bulunmuş *Derma-centor reticulatus*

kenesinden izole edilen *B. canis canis* izolatıyla (DQ181656); TrKysBccan 2 izolatu ise %99,7 oranı ile hem bir önceki Macaristan izolatıyla (DQ181656) ve hem de Macaristan'da diğeri bir köpekten çıkarılmış *D. reticulatus*'tan izole edilen diğeri bir *B. canis canis* izolatıyla (AY942185) benzerlik göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada izole edilen *B. canis vogeli* TrKysBcvog 1 izolatu, İstanbul'da iki köpekten izole edilen Turk 1 (AM183215) ve Turk 2 (AM183216) izolatları ile %100 identiklik gösterirken; TrKysBcvog 2 izolatu ise en yüksek identikliği %99,8 ile Brezilya'da bir köpek (AY371194) ve kediden (EF636702), Venezuela'da bir köpekten (DQ297390) ve Saint Kitts ve Nevis Federasyonu'nda bir köpekten (JX112785) izole edilmiş *B. canis vogeli* izolatları ile vermiştir. Diğeri yandan bu çalışmada *B. gibsoni* TrKysBgib 2 ve TrKysBgib 3 izolatlarının Çin'de iki farklı köpekten izole edilmiş *B. gibsoni* 813B (HQ718716) ve 854B (HQ718722) izolatları ile Hırvatistan'da bir köpekten izole edilmiş *B. gibsoni* izolatıyla (FJ209023) %100 identik olduğu saptanmıştır. Buna karşılık TrKysBgib1 izolatu en yüksek identikliği %99,8 ile aynı izolatlarla [Çin'in (HQ718716), (HQ718722) ve Hırvatistan'ın (FJ209023)] göstermiştir.

Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME): *Ehrlichia canis*, köpeklerde Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME)'inden sorumlu olan riketsial gram-negatif bir bakteri olup (127, 128, 129) genel olarak *Rhipicephalus* cinsindeki keneler tarafından nakledilir (130, 131). *E. canis* dünya çapında yayılım göstermesine karşın tropik ve subtropik bölgelerde daha sık görülür (132, 133, 134, 135, 136). Enfeksiyonun şiddeti, konağın immun sistemi, yaş, ırk ve koinfeksiyonlar gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Hastalığa bağlı klinik tablo coğrafik bölgeye göre değişiklik göstermekle birlikte genel olarak anemi, trombositopeni ve lökopeni tarzında ortaya çıkmaktadır (137, 138). Enfeksiyonun tanısında CME klinik tablosunun yanında mikroskopik ve serolojik teşhis yöntemleri geçmişten günümüze kullanılan tanı yöntemleri olmuştur. Ancak son zamanlarda PCR tabanlı moleküler teknikler, CME'nin teşhisinde daha duyarlı ve özgül teknikler olarak daha yaygın kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla yaygın şekilde tercih edilen gen bölgelerinin başında 16S rRNA gen bölgesi gelmekte olup bu gen bölgesi *E. canis*'in farklı suşları ve genotiplerinin ayırımında kullanılmaktadır (139).

Türkiye'de, köpeklerde *E. canis* enfeksiyonları üzerine yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Şimdiye kadar yapılmış çalışmaların da ağırlıklı olarak antikör saptamaya yönelik olduğu görülmektedir. Batmaz ve ark. (69) *E. canis* seroprevalansını; Marmara, Ege, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinden örnekledikleri 249 köpekte %20,77 olarak rapor etmişlerdir. Sinop'ta klinik olarak sağlıklı 93 köpekte ELISA yöntemiyle %18,28 oranında *E.*

canis seropozitifliği belirlenmiştir (140). Aslantaş ve ark. (141), Gaziantep, Hatay ve Adana'dan örnekledikleri 288 sokak köpeğinde IFA testi ile %14,6 oranında seropozitiflik bildirmişlerdir. Diyarbakır'da örneklenen 82 köpeğin *E. canis* yönünden ELISA ile serolojik bakısında % 4,8 oranında seropozitiflik bildirilmiştir (142). Cihan ve ark. (143), Ayvalık, Burhaniye, Dikili, Edremit ve Bergama'dan örneklenen 160 köpeğin IFA tekniği ile incelemesinde % 69,4 oranında *E. canis* seropozitifliği tespit etmişlerdir. Aydın yöresinde örneklenen 224 köpeğin IFAT tekniği ile 36,2% *E. canis* seropozitifliği belirlenmiştir (144). Yağcı ve ark. (145), Kırıkkale'de 122 köpeğin IFA testi ile incelemesinde %14,75 seropozitiflik tespit etmişlerdir. Öte yandan son zamanlarda Türkiye'de CME üzerine bir kaç moleküler çalışma da yapılmıştır. Unver ve ark. (72), Ankara'da klinik görünüm olarak ehrlichiosis'le uyumlu 12 köpeğin 3'ünü konvansiyonel PCR ile *E. canis* yönünden pozitif bulunmuştur. Aydın yöresinde Doxycycline-Chloroquine kombinasyonunun Canine Monocytic Ehrlichiosis'inin tedavisinde etkinliğinin araştırılması amacıyla yürütülen bir çalışmada (146), CME klinik şüpheli olan, mikroskopik ve ELISA testleri ile pozitif belirlenen 12 köpek Nested PCR ile *E. canis* pozitifliği yönünden konfirme edilmiştir. Bu çalışmada ise Türkiye'de köpeklerde ehrlichiosis enfeksiyonu moleküler olarak ilk kez Real Time PCR yöntemiyle geniş çaplı araştırılmıştır. İncelemesi yapılan 400 köpekte *E. canis* %14,5 ile en yaygın tür belirlenmiştir. Elde edilen bu moleküler prevalansın Türkiye'deki bazı serolojik çalışmalarda (140, 141, 145) elde edilen prevalans oranlarına paralel olduğu dikkati çekmiştir. Ayrıca parazitemi açısından pozitif örneklerde ortalama Ct (dR) değeri de $34,0 \pm 0,8$ olarak bulunmuştur. Bu değer araştırma yöresinde *E. canis* enfeksiyonlarının yüksek parazitemi ile seyretmediğini göstermiştir.

Diğer yandan 16S rRNA gen bölgesi *E. canis*'in farklı suşları ve genotiplerinin ayırımında göstermiş olduğu yüksek korunmuş bölgeler ile yaygın olarak kullanılmaktadır (139). Bu çalışmada 16S rRNA gen bölgesine göre saptanan *E. canis* izolatları arasında nükleotid farklılıklarının oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *E. canis* izolatlarının (TrKysEcan1-3) pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında %100 identik oldukları, dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında ise ortalama %0,1 farklılık bulunduğu tespit edilmiştir. TrKysEcan1-3 izolatlarının 16S rRNA gen bölgesine göre Venezuela (AF373613), Türkiye (AY621071), Yunanistan (EF011110), Tayvan (EU106856) ve İtalya'da (EU439944) köpeklerden bildirilen izolatlarla %100,0 identik olduğu görülmüştür.

Granulositik Anaplasmosis: Granulositik anaplasmosis insan ve hayvanlarda trombositopeni ile birlikte seyreden bir multiorgan enfeksiyonudur. Hastalığa tol açan etkenler daha önceden *Rickettsiaceae* ailesi, *Ehrlichia* soyunda klasifiye edilmiştir. Ancak daha sonradan filogenetik çalışmalar ışığında etkenler *Rickettsiales* takımında, *Anaplasmataceae* ailesi içinde klasifiye edilmiştir (37). 16S rRNA geni üzerine filogenetik çalışmalar, önceden kedi ve köpeklerde *A. phagocytophilum*, atlarda *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia equi* ve insanlarda HGE agent – human granulocytic ehrlichiosis agent olmak üzere ayrı türler olarak klasifiye edilen etkenlerin *A. phagocytophilum* şeklinde tek tür olarak klasifiye edilmesini sağlamıştır (37). *A. phagocytophilum* insanlarla birlikte bir çok hayvan türünü enfekte edebilme yeteneğinde bir mikroorganizmadır. Etkenin Avrupadaki esas vektörünün *Ixodes ricinus* olduğu kaydedilmektedir (147, 148). *A. phagocytophilum* ile enfekte köpeklerde klinik semptomlar spesifik olmamakla birlikte genellikle ateş, letarji, trombositopeni, depresyon ve anoreksi ortaya çıkabilmektedir (149). Deneysel enfekte köpeklerin sadece orta düzeyde semptomlar gösterdiği belirtilmiştir (150). Enfekte köpeklerde granulositlerdeki morulanın saptanması *A. phagocytophilum*'un teşhisinde yeterli değildir ve daha ileri testlerle konfirmasyonu gerekmektedir (150, 151). Lester ve ark. (153), Kirtz ve ark. (153, 154) ve Pusterla ve ark. (155), enfekte köpeklerde granulositlerin %5-37 oranında anaplasmosis gösterdiğini kaydetmişlerdir. *A. phagocytophilum*'un teşhisinde IFA ve 16S rRNA genlerinin amplifikasyonu en yaygın kullanılan teknikler olmuştur (154). Bu çalışmada köpeklerde *A. phagocytophilum* araştırılmasında Courtney ve ark. (55) tarafından *A. phagocytophilum* msp2 gen bölgesinden dizayn edilmiş spesifik primerler ve TaqMan probu ile Real Time PCR tekniği kullanılmıştır. Konvansiyonel ve Nested PCR yöntemlerine oranla daha duyarlı ve avantajlı olarak bildirilen (55) bu teknik ile köpeklerde *A. phagocytophilum* moleküler prevalansı %7,8 olarak belirlenmiştir. Türkiye’de *A. phagocytophilum*'un köpeklerde moleküler olarak araştırıldığı yalnızca bir çalışma (75) bulunmaktadır. Söz konusu çalışmada klinik semptomlu 10 köpeğin 4’ünde konvansiyonel PCR ile *A. phagocytophilum* pozitifliği saptanmıştır. Bunun yanında Giresun, Trabzon ve Rize’de enfeste insanlardan toplanmış ixodid kenelerden oluşturulan genomik DNA havuzlarında *A. phagocytophilum*'un Nested PCR ile araştırıldığı bir çalışmada (156) *I. ricinus* erginlerinde %17,0 ve *Ixodes* sp. nimflerinde ise %22,2 oranında pozitiflik saptanmış ve sonuçlar sekans analizleri ile konfirme edilmiştir. İstanbul ve Kırklareli’de sahadan toplanmış 241 *I. ricinus* kenesinde konvansiyonel PCR ile were İstanbul’da %2,7, Kırklareli’nde ise % 17,5 oranında *A. phagocytophilum* pozitifliği bildirilmiştir (157). Türkiye’de Karadeniz Bölgesinde sığırlardan toplanmış

Haemaphysalis sulcata ve *I. ricinus* kenelerinden oluşturulmuş havuzlarda RLB tekniği ile *A. phagocytophilum*'un moleküler prevalansı, sırasıyla %3,3 ve %7,6 olarak tespit edilmiştir (158).

AnkA geni 150-160 kDA moleküler ağırlığında bir protein antijenini kodlayan bir gen bölgesi olup amino uçlarında tekrarlayan ankyrin motiflerini bulundurur. AnkA proteinin analizi membranda değil bakteriyel sitoplazmada lokalizasyonu gösterir. Enfeksiyon süresince, protein granüositlerin çekirdeğine yakın olarak ökaryotik hücre içerisine transfer olur. Böylece *A. phagocytophilum* AnkA üzerinden konak nötrofillerini manüple etme yeteneğine sahiptir (159, 160, 161). AnkA geni, bu özelliği ve konservatif yapı göstermesi ile *A. phagocytophilum*'un moleküler filogenetik çalışmalarında tercih edilen gen bölgelerinden biri olmuştur. Bu çalışmada Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *A. phagocytophilum* izolatlarının (TrKysAp1-3) AnkA gen bölgesinin filogenetik analizine göre kendi aralarında %99,8±0,2 identik oldukları, dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla ise aralarında ortalama %0,9±0,3 farklılık bulunduğu belirlenmiştir. TrKysAp1 ve TrKysAp2 izolatlarının Polonya'da vahşi ruminanttan izole edilen PZA-2 izolatı (JN005741) ile, TrKysAp3 izolatının ise Almanya'da köpekten, Polonya'da yaban domuzundan ve Ürdün'den köpeklerden izole edilen sırasıyla dog-34 (GU236841), 450-7 (GU434669), 10 (JN033795) ve 31 (JN033798) izolatlarıyla filogenik olarak en yüksek identikliği gösterdiği tespit edilmiştir.

Canine Hepatozoonosis (CH): İlk olarak Hindistan'daki bir köpekten izole edilen ve o dönemde *Leucocytozoon canis* olarak isimlendirilen *Hepatozoon canis*, köpeklerde Eski Dünya canine hepatozoonosis'inden (CH) sorumlu olup vektör kene *Rhipicephalus sanguineus* tarafından nakledilen bir apicomplexan protozoondur. *H. canis*, vahşi köpek ve kedilerde görülen bir tür olup özellikle Kuzey Avrupa, Asya, Afrika, Güney Amerika ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yaygındır (25, 33, 162). *H. canis* enfeksiyonları sıklıkla *Toxoplasma gondii*, *E. canis*, *Babesia canis*, *Mycoplasma haemocanis* ve Parvovirus enfeksiyonları ile birlikte seyretmektedir (162). *H. canis*'in patojenitesi düşük olup genellikle dalak, lenf nodülleri ve kemik iliğini etkileyerek anemi ve letarjiyle karakterize subklinik enfeksiyonlara sebep olmaktadır. CH'de, dolaşım sistemindeki beyaz kan hücrelerinde gametositlerin görülmesi sıklıkla rastlanan bir durum olup hastalık, mikroskopik olarak kolaylıkla teşhis edilebilmektedir (163, 164). Enfeksiyonun teşhisinde tüm Dünya'da mikroskopik, serolojik ve moleküler teşhis yöntemleri kullanılmış ve halen de

kullanılmaktadır. Moleküler tabanlı filogeni çalışmalarında *H. canis* için en yaygın kullanılan gen bölgesi 18S rRNA gen bölgesidir (162).

Türkiye’de köpeklerde *H. canis* konusunda yapılan çalışmaların oldukça sınırlıdır. Mikroskopik olarak; Ege Bölgesinde yapılan çalışmalarda Paşa ve ark. (75), 10 doğal enfekte köpekte *H. canis*’in parazitemisinin %1-23, Kiral ve ark. (165), ise 14 doğal enfekte köpekte *H. canis*’in parazitemisinin %0,1-33 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Voyvoda ve ark. (166), bir olguda köpekte mikroskopik olarak *H. canis* pozitifliğini bildirmiştir. Karagenc ve ark. (68), *H. canis*’in prevalansını mikroskopik %10,6, serolojik %36,8 ve moleküler (18S rRNA gen bölgesini hedef alan standart PCR ile) %25,8 olarak rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada Türkiye’de köpeklerde *H. canis*’in varlığı, moleküler olarak ilk kez Real Time PCR yöntemiyle araştırılmıştır. İncelemesi yapılan 400 köpekte *H. canis* pozitifliği, %5,3 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu moleküler pozitiflik, daha önce bildirilere göre düşüktür. Ayrıca pozitif örneklerde parazitemi için ortalama Ct (dR) değeri de $34,4 \pm 1,1$ olarak bulunmuştur. Bu değer, araştırma yöresinde *H. canis* enfeksiyonlarının yüksek parazitemi ile seyretmediğini göstermiştir.

Öte yandan 18S rRNA gen bölgesi *H. canis*’in farklı suşları ve genotiplerinin ayrımında korunmuş gen bölgesi özelliği açısından en sık kullanılan gen bölgesidir (33). Çalışmada 18S rRNA gen bölgesine göre saptanan *H. canis* izolatları arasında çeşitli nükleotid farklılıkları saptanmıştır. Kayseri yöresinde köpeklerde saptanan *H. canis* (TrKysHcan1-2) izolatlarının pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında %100 identik oldukları, dünyadan alignmentta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında ise ortalama $0,2 \pm 0,1$ farklılık bulunduğu tespit edilmiştir. TrKysHcan1-2 izolatlarının 18S rRNA gen bölgesine göre Ürdün (JF827605), Türkiye (JQ867390, DQ060327) ve Nijerya’da (JQ976622) köpeklerden bildirilen izolatlarla %100,0 identik oldukları görülmüştür.

Neosporosis: Hastalık etkeni *Neospora caninum* ilk kez 1984 yılında ensefalomyelitis ve miyositisli bir köpekte tespit edilmiştir (167). Etkenin, Meksika’da 1987 yılında bir abort salgını sırasında sütçü sığırlarda tespit edilmesinden sonra özellikle son onbeş yılda tüm dünyada abort vakalarının birçoğuna sebep olduğu anlaşılmıştır (168). Heteroksen bir protoozoon olan *N. caninum*’un son konağı köpek, arakonağı ise sığır, koyun, geyik ve atlardır. Bu arakonaklarda hastalık klinik olarak tespit edilmesine karşın, mandalarda, gri tilkilerde, koyotlarda, develerde ve kedigillerde sadece antikor tespit edilmiştir (169).

Neospora caninum sporozoa sınıfında bulunan diğer protozoonlara benzer bir gelişme göstermektedir. *Neospora caninum* köpeklerin sindirim sisteminde endodiyogeni ile çoğalmakta, ookistler dışkı ile dışarı atılmaktadır. Ookistler yem ve sularla arakonaklar tarafından alınmaktadır. Köpekten köpeğe plasental bulaşma söz konusu olabilmektedir. Hastalığa yakalanmış köpeklerde enfeksiyonun ömür boyu sürdüğü kabul edilmektedir. Takizoitler ve bradizoitler köpek dahil *N. caninum*'la infekte olabilen bütün canlılarda bulunabilirler. Akut enfekte köpeklerde gittikçe artan paraliz, omurilik anomalileri, boyun ağrıları, disfaji ve meningoensefalomyelitis sonunda ölüm görülebilir (48, 170). Köpekler enfekte sığır etlerini yemekle enfeksiyonu alırlar. Köpeklerde parazitler beyin, spinal kanal, retina, kas, kalp, karaciğer, böbrek, mide, adrenal bezler ve deri gibi bir çok organ ve dokuya yerleşim göstererek kist oluşumuna yol açabilmektedir (171). Kronik enfeksiyona yol açan kistler uzun müddet canlılıklarını korurlar. Konak immun sistemi baskılandığında parazitler tekrar aktivasyona geçerler (51). IFAT, ELISA, DAT, Western blot gibi serolojik teşhis yöntemleri *N. caninum*'un teşhisinde yaygın kullanılan ve öncelikli yöntemler olarak nitelenmektedir (172). Ancak seroloji tabanlı teknikler indirekt teşhis yöntemleri olup aynı zamanda bu yöntemlerle erken veya kist oluşumunun şekillendiği kronik enfeksiyonlarda yalancı negatiflikler ortaya çıkabilmektedir. Bu açıdan immunohistokimya, hayvan inokulasyonları ve moleküler tanı teknikleri gibi direkt tanı yöntemlerinin bu tüm durumlarda daha kullanışlı olduğu kaydedilmektedir (172). Özellikle moleküler tanı yöntemlerinin diğer direkt tanı tekniklerinden daha spesifik olduğu bildirilmiştir (172). *N. caninum*'un moleküler teşhis ve karakterizasyonunda yüksek orandaki korunmuşluk özelliğinden dolayı ITS1 gen bölgesine oranla esas hedef olarak Nc5 gen bölgesi daha fazla tercih edilmektedir (173).

Bu çalışmada köpek kan örnekleri, Nc5 gen bölgesini hedef alan primerler ve TaqMan probu (57) ile *N. caninum* yönünden analiz edilmişlerdir. İncelenen 400 köpek kan örneğinin 15'inde (%3,8) qPCR ile *N. caninum* pozitifliği saptanmıştır. Pozitif örneklerde Ct değerlerine (ort. 38,4±0,5) göre paraziteminin oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Nitekim konvansiyonel PCR ile bu örneklerde jel üzerinde görüntü alınamamış ve dolayısıyla sekans analizleri yapılamamıştır. *N. caninum*'un perifer kanda moleküler olarak saptanmış olması, akut bir enfeksiyonu gösterebileceği gibi immun sistemin baskılanması sonucu kist içerisindeki parazitlerin reaktif olabildiğini de düşündürmektedir. Nitekim benzer şekilde King ve ark. (174) da, Avustralya'da köpeklerde yaptıkları çalışmada 41 köpeğin perifer kan örneklerinden üçünde konvansiyonel PCR ile *N. caninum* pozitifliğini tespit etmişlerdir. Bu

Çalışmada *N. caninum* pozitifliği için geçerli bu durum, benzer şekilde *T. gondii* için de hipotez edilmiştir. Bu kapsamda köpek kan rnekleri, *T. gondii* spesifik primerler ve TaqMan probu ile qPCR’da analiz edilmiş ancak *T. gondii* pozitifliği belirlenmemiştir. Bununla birlikte diğer türlere özgü primer ve probalarla duplex olarak çalışılan *T. gondii* için qPCR analizlerinde Ct değerleri çok düşük pozitifliklere (20 örnek, yalancı pozitiflik) rastlanmış olup bu sonuçlar VBDS’12 sempozyumunda sehven *T. gondii* pozitif olarak verilmiştir. Doğrulamak için takiben yapılan Tek Yönlü qPCR analizlerinde, bu örneklerin kesin olarak negatif oldukları teyit edilmiştir. Söz konusu yalancı pozitifliklerin duplex reaksiyonda kullanılan primerler ve problemlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkabilecek floresan ışımadan kaynaklandığı dşnlmştir.

Sonuç olarak bu çalışmayla Türkiye’de ilk kez, Kayseri yöresinde köpeklerin vektör-borne ve food-borne protozoon enfeksiyonlarının moleküler prevalansları kantitatif Real Time PCR tekniği ile ortaya konmuştur. Bu alışma da yine Türkiye’de ilk kez köpeklerde *N. caninum* moleküler olarak saptanmıştır. Bu çalışmada köpeklerde enfeksiyona yol açan bazı türlerin çeşitli gen bölgeleri moleküler olarak karakterize edilmiş ve filogenetik analizleri geerleştirilmiştir. Ayrıca model olma özelliğine sahip bu çalışma, daha sonra yapılacak araştırmalara da ışık tutacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Friedhoff KT. Tick-borne diseases of sheep and goats caused by *Babesia*, *Theileria* or *Anaplasma* spp. *Parassitologia* 1997; 39: 99-109.
2. Shaw ES, Day MJ. Arthropod-borne infectious diseases of the dogs and cats. Lippincott Williams & Wilkins, 2005: p 1-150.
3. Criado-Fornelio A, Rey-Valeiron C, Buling A et al. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Vet. Parasitol* 2007; 144: 261-269.
4. Irwin PJ. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors* 2009; 2(Suppl 1): 51-54.
5. Peleg O, Baneth G, Eyal O, Inbar J, Harrus S. Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. *Vet Parasitol* 2010; 173(3-4): 292-299.
6. Taboada J, Merchant SR. Babesiosis of companion animals and man. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1991; 21: 103-123.
7. Beck R, Vojta L, Mrljak V et al. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int J Parasitol* 2009; 39: 843-848.
8. Kuttler KL. World-wide impact of Babesiosis. In: Ristic, M (Ed), *Babesiosis domestic animals and man*. CRC Press, Boca Raton, FL 1988: p 1-22.
9. Uilenberg G, Franseen FFJ, Perie NM, Perie M, Spanjer AAM. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet Q* 1989; 11(1): 33-40.
10. Kjemtrup AM, Kocan AA, Whitworth L et al. There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1501-1505.
11. Kjemtrup AM, Wainwright K, Miller M, Penzhorn BL, Carreno RA. *Babesia conradae*, sp. nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Vet Parasitol* 2006; 138: 103-111.
12. Zahler M, Rinder H, Zweygarth E et al. *Babesia gibsoni* of dogs from North America and Asia belong to different species. *Parasitology* 2000; 120: 365-369.
13. Birkenheuer AJ, Neel J, Ruslander D, Levy MG, Breitschwerdt EB. Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Vet Parasitol* 2004; 124: 151-160.
14. Lehtinen LE, Birkenheuer AJ, Drolesky RE, Holman PJ. In vitro cultivation of a newly recognised *Babesia* sp. in dogs in North Carolina. *Vet Parasitol* 2008; 151: 150-157.
15. Hartelt K, Rieker T, Oehme RM et al. First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Western Europe. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2007; 7: 163-166.

16. Caccio SM, Antunovic B, Moretti A et al. Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Vet Parasitol* 2002; 106: 285-292.
17. Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Sarana A, Barba-Carretero JC. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in Southern Europe-part I: epizootiological aspects. *Vet Parasitol* 2003; 113: 189-201.
18. Duh D, Tozon N, Petrovec M, Strasek K, Avsic-Zupanc TR. Canine babesiosis in Slovenia: molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. *Vet Res* 2005; 35: 363-368.
19. Oyamada M, Davoust B, Boni M et al. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 1343-1346.
20. Matjila PT, Nijhof AM, Taoufik A et al. Autochthonous canine babesiosis in The Netherlands. *Vet Parasitol*, 2005; 131: 23-29.
21. Goethert HK, Telford SR. What is *Babesia microti*? *Parasitology* 2003; 127: 301-309.
22. Garcia AT. Piroplasma infection in dogs in northern Spain. *Vet Parasitol* 2006; 138: 97-102.
23. Schetter TP, Klauskens J, Scholtes NC, Pasman JW, Goovarest D. Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection. *Vet Parasitol* 1997; 73: 35-41.
24. Schetter TP, Moubri K, Precigout E et al. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. *Parasitology* 1997; 115: 485-393.
25. Ewing SA, Panciera RJ. American Canine Hepatozoonosis. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 688-697.
26. Baneth G, Vincent-Johnson N. Hepatozoonosis. In: Shaw ES, Day MJ (eds), *Arthropod-borne infectious diseases of the dogs and cats*. Lippincott Williams & Wilkins 2005: p 78-88.
27. Little SE, Allen KE, Johnson EM et al. New developments in canine hepatozoonosis in North America: a review. *Parasites & Vectors* 2009; 2 (Suppl 1): 1-5.
28. Baneth G, Samish M, Alekseev E, Aroch I, Shkap V. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J Parasitol* 2001; 87: 606-611.
29. Baneth G, Samish M, Shkap V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *J Parasitol* 2007; 93: 283-299.
30. Craig TM. Hepatozoonosis. In: Greene CE (ed), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 2nd Edition. Philadelphia, WB Saunders 1998: p 458-465.

31. Ewing SA, Mathew JS, Panciera RJ. Transmission of *Hepatozoon americanum* Apicomplexa: Adeleorina) by Ixodids (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 2002; 39: 631-634.
32. Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. Vet Parasitol 2008; 152: 173-185.
33. Vojta L, Mrljak V, Curkovic S et al. Molecular epizootiology of canine hepatozoonosis in Croatia. Int J Parasitol 2009; 39(10): 1129-1136.
34. Allen KE, Li Y, Kaltenboeck B et al. Diversity of *Hepatozoon* species in naturally infected dogs in the southern United States. Vet Parasitol 2008; 154: 220-225.
35. Li Y, Wang C, Allen K et al. Diagnosis of canine *Hepatozoon* spp. infection by quantitative PCR. Vet Parasitol 2008; 157: 50-58.
36. Uilenberg G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. Vet Parasitol 1995; 57: 9-41.
37. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51: 2145-2165.
38. Uilenberg G, Thiaucourt F, Jongejan F. On molecular taxonomy: what is in a name? Exp Appl Acarol 2004; 32(4): 301-312.
39. Harrus S, Waner T, Björndorff A, Shaw S. Ehrlichiosis and anaplasmosis. In: Shaw ES, Day MJ (eds), Arthropod-borne infectious diseases of the dogs and cats. Lippincott Williams & Wilkins 2005: p 120-133.
40. Beugnet F, Marie' JL. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. Vet Parasitol 2009; 163: 298-305.
41. Ristic M, Holland CJ. Canine ehrlichiosis. In: Woldehiwet Z, Ristic M (eds), Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals. Pergamon, Oxford, UK 1993: p 169-186.
42. Skotarczak B. Canine ehrlichiosis. Ann Agric Environ Med 2003; 10(2): 137-141.
43. İnci A, Düzlü Ö. Vektörler ve Vektörlerle Bulaşan Hastalıklar. ERÜ Vet Fak Derg 2009; 6(1): 53-64.
44. Cao WC, Zhao QM, Zhang PH. Granulocytic ehrlichiae in *Ixodes persulcatus* ticks from an area in China where Lyme disease is endemic. J Clin Microbiol 2000; 38: 4208-4210.
45. Bown KJ, Lambin X, Telford GR. Relative importance of *Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps* as vectors for *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in field vole (*Microtus agrestis*) populations. Appl Environ Microbiol 2008; 74: 7118-7125.

46. Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE. Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review. J Vet Intern Med 2009; 23: 1129-1141.
47. Marsh AE, Barr BC, Sverlow K et al. Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. J Parasitol 1995; 81(4): 530-535.
48. Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet Parasitol 1996; 67: 1-59.
49. Dubey JP, Buxton D, Wouday W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. J Comp Path 2006; 134: 267-289.
50. Williams DJL, Trees AJ. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum* -infected cattle. Parasite Immunol 2006; 28: 61-67.
51. Georgieva DA, Prelezov PA, Koinarski VTS. *Neospora caninum* and Neosporosis in animals - a review. Bulg J Vet Med 2006; 9(1): 1-26.
52. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Inc Boca Raton, Florida 1988.
53. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 1998; 28: 1019-1024.
54. Waner T, Strenger C, Keysary A, Harrus S. Kinetics of serologic cross-reaction between *Ehrlichia canis* and the *Ehrlichia phagocytophila* genogroups in experimental *E. canis* infection in dogs. Vet Immunol Immunopathol 1998; 66: 237-243.
55. Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF. Multiplex real-time PCR for detection of anaplasma phagocytophilum and *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol 2004; 42(7): 3164-3168.
56. Criado-Fornelio A, Buling A, Cunha-Filho NA et al. Development and evaluation of a quantitative PCR assay for detection of *Hepatozoon* sp. Vet Parasitol 2007; 150(4): 352-356.
57. Ghalmi F, China B, Kaidi R, Daube G, Losson B. Detection of *Neospora caninum* in dog organs using real time PCR systems. Vet Parasitol 2008; 155(1-2): 161-167.
58. Kasper DC, Sadeghi K, Prusa AR et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 63(1): 10-15.
59. Gören S, Yetkin R. Tek tırnaklıda, sığırdada, koyunda, keçide ve köpekte piroplazmoz. MMB Bakt Evi Yayını, Ulun basımevi, Ankara 1935.
60. Özcan CH. Ankara ve çevarında evcil hayvanlarda görülen piroplazmoz vakaları ve tedavileri üzerine araştırmalar. Ankara Üniversitesi Basımevi 1961: p 10-106.

61. Ulutaş B, Paşa S, Karagenc T, Bayramlı G. Atipik babesiosisli iki köpekte klinik görünüm. 5. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi. Van, Poster bildiri 2003; s 165.
62. Ulutaş B, Bayramlı G, Ulutaş PA, Karagenç T. Serum concentration of some acute phase protein in naturally accuring canine babesiosis: A preliminary study. Vet Clin Pathol 2005; 34: 144-147.
63. Kırılı G. Ege bölgesinde köpek babesiosisinin yaygınlığı. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın 2006.
64. Gülanber A, Gorenflot A, Schetters TP, Carcy B. First molecular diagnosis of *Babesia vogeli* in domestic dogs from Turkey. Vet Parasitol 2006; 139: 224-230.
65. Aysul N. İstanbul ile köpeklerinde bulunan *Babesia* türlerinin teşhisinde mikroskopik ve PCR-RLB bulgularının karşılaştırılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2006.
66. Tüzdil AN. Bizde ilk defa görülen bir *Hepatozoon canis* vakası. Türk Bay Cem Mec 1933; 13: 35.
67. Voyvada H, Pasa S, Unver A. First clinical case of pure *Hepatozoon canis* of a dog in Turkey. J Small Anim Pract 2004; 45: 613-617.
68. Karagenc TI, Pasa S, Kirli G et al. A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. Vet. Parasitol 2006; 135: 113-119.
69. Batmaz H, Nevo E, Waner T et al. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* antibodies amonds dogs in Turkey. Vet Rec 2001; 148: 665-666.
70. Erdeğer J, Sancak A, Ataseven L. Köpeklerde *Ehrlichia canis*'in indirect flouresan antikor (IFA) testi ve dot-ELISA ile saptanması. Turk J Vet Anim Sci 2003; 27: 767-773.
71. Dodurka HT, Bakırel U. Bir köpekte ehrlichiosis olgusu. İÜ Vet Fak Derg 2002; 2: 1-9.
72. Unver A, Rikihisa Y, Borku K, Ozkanlar Y, Hanedan B. Molecular detection and characterization of *Ehrlichia canis* from dogs in Turkey. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2005; 118(7-8): 300-304.
73. Ulutaş B, Bayramlı G, Ulutaş PA, Karagenç T. First case of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* infection in a dog in Turkey. Turk J Vet Anim Sci 2007; 31: 279-281.
74. Karagenc T, Hosgor M, Bilgic HB et al. Ege bölgesinde köpeklerde *E. canis*, *A. phagocytophila*, *A. platys*'in prevalansının nested PCR ile tespiti, 14. Ulusal Parazitoloji Kongresi Bildiri Kitabı, 18-25 Eylül 2005, İzmir.
75. Paşa S, Kırıl F, Karagenc T, Atasoy A, Seyrek K. Description of dogs naturally infected with *Hepatozoon canis* in the Aegean region of Turkey. Turk J Vet Anim Sci 2009; 33: 289-295.

76. Aktas M, Altay K, Dumanli N, Kalkan A. Molecular detection and identification of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species in ixodid ticks. *Parasitol Res* 2008; 104(5): 1243-1248.
77. Aktas M, Vatansever Z, Altay K, Aydin MF, Dumanli N. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from Turkey. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 104: 10-15.
78. Inci A, Babür C, Kalinbacak A. Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies using Sabin-Feldman dye test in dogs in a military farm in Gemlik. *T Parazitol Derg* 1996; 20 (3-4): 413-416.
79. Inci A, Babür C, Cam Y, Ica A. The seroprevalence of *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1908) in dogs around Kayseri. *T Parazitol Derg* 2002; 26(3): 221-223.
80. Simsek S, Ütük AE, Babür C, Köroğlu E. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs in the province of Kocaeli. *T Parazitol Derg* 2006; 30(3): 171-174.
81. Babür C, Altas MG, Celebi B et al. Seroprevalence of toxoplasmosis, leishmaniosis and listeriosis in stray dogs in the province of Sanliurfa, Turkey. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2007; 64 (3): 11-16.
82. Öncel T, Handemir E, Kamburgil K, Yurtalan S. Determination of seropositivity for *Toxoplasma gondii* in stray dogs in Istanbul, Turkey. *Revue Méd Vét* 2007; 158(5): 223-228.
83. Kılıç S, Babür C, Özkan AT, Mamak N. Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Leishmania infantum* antibodies among Sivas Kangal dogs. *Tr J Vet Anim Sci* 2008; 32(4): 299-304.
84. Şahal M, Gazyağcı S, Kılıç S, Babür C, Ural K. Ankara ili sokak köpeklerinde toxoplasmosis araştırılması. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg* 2009; 4(3): 185-189.
85. Gıcık Y, Sarı B, Babür C, Celebi B. The seropositivity of *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in the dogs of Kars and vicinity. *T Parazitol Derg* 2010; 34(2): 86-90.
86. Icen H, Babür C, Bademkiran S et al. Seroprevalance of toxoplasmosis, leishmaniosis and listeriosis in shelter dogs of Diyarbakir, Turkey. *T Parazitol Derg* 2010; 34(1): 6-10.
87. Balkaya I, Aktas MS, Ozkanlar Y, Babur C, Celebi B. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs in eastern Turkey. *Isr J Vet Med* 2010; 65(2): 58-56.
88. Batmaz H, Senturk S, Aydin L. Clinical neosporosis in a dog in Turkey. *Aust Vet Pract* 2004; 34(3): 129-131
89. Yıldız K, Duru SY, Yagci BB et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* and coexistence with *Toxoplasma gondii* in dogs. *T. Parazitol Derg* 2009; 33(2): 116-119.
90. Duarte SC, Parente JA, Pereira M, Soares CM, Linhares GF. Phylogenetic characterization of *Babesia canis vogeli* in dogs in the state of Goiás, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 2011; 20(4): 274-280.

91. Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symposium Series 1999; 41:95-98.
92. Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, et al. Geneious v5.5, Available from <http://www.geneious.com> (25.04.2013).
93. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, Molecular Biology and Evolution (submitted) 2011.
94. Hsieh YC, Lee CC, Tsang CL, Chung YT. Detection and characterization of four novel genotypes of *Ehrlichia canis* from dogs. Vet Microbiol 2010; 146(1-2): 70-75.
95. Walls JS, Caturegli OP, Bakken JS, Asanovich KM, Dumler JS. Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis using epank1 genes of *Ehrlichia phagocytophila*-group ehrlichiae. J Clin Microbiol 2000; 38: 354-356.
96. Inokuma H, Okuda M, Ohno K, Shimoda K, Onishini T. Analysis of the 18S RNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two japanese dogs. Vet Parasitol 2002; 106: 265-271
97. Vargas-Hernandez G, André MR, Munhoz TD et al. Molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from Colombia. Parasitol Res, 2012; 110(1): 489-492.
98. Slapeta JR, Modry D, Kyselova, I et al. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. Vet Parasitol 2002; 109: 157-167.
99. Monteiro RM, Richtzenhain LJ, Pena HF et al. Molecular phylogenetic analysis in Hammondia-like organisms based on partial Hsp70 coding sequences. Parasitology 2007; 134(Pt9): 1195-1203.
100. Silva MS, Uzêda RS, Costa KS et al. Detection of *Hammondia heydorni* and related coccidia (*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*) in goats slaughtered in Bahia, Brazil. Vet Parasitol 2009; 162(1-2): 156-159.
101. Solano-Gallego L, Baneth G. Babesiosis in dogs and cats- expanding parasitological and clinical spectra. Vet Parasitol 2011; 181: 48-60.
102. Miyama T, Sakata Y, Shimada Y et al. Epidemiological survey of *Babesia gibsoni* infection in dogs in eastern Japan. Vet Med Sci 2005; 67: 467-471.
103. Purnell RE. Babesiosis in various hosts. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. Academic Press, New York, 1981: p 25-63.
104. Conrad PA, Thomford JW, Marsh A et al. Ribosomal DNA probe for differentiation of *Babesia microti* and *B. gibsoni* isolates. J Clin Microbiol 1992; 30: 1210-1215.
105. Gasser RB. Molecular tools-advances, opportunities and prospects. Vet Parasitol 2006; 136: 69-89.

106. Passos LMF, Geiger SM, Ribeiro MFB, Pfister K, Zahler-Rinder M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 127: 81-85.
107. Trapp SM, Messick JB, Vidotto O, Jojima FS, Morais HSA. *Babesia gibsoni* genotype A 'sia in dogs from Brazil. *Vet Parasitol* 2006; 141: 177-180.
108. Yamasaki M, Inokuma H, Sugimoto C et al. Comparison and phylogenetic analysis of the heat shock protein 70 gene of *Babesia* parasites from dogs. *Vet Parasitol* 2007; 145: 217-227.
109. Zahler M, Rinder H, Schein E, Gothe R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet Parasitol* 2000; 89: 241-248.
110. Camacho AT, Pallas E, Gestal JJ et al. Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. *Vet Rec* 2001; 3: 552-555.
111. Zahler M, Schein E, Rinder H, Gothe R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitol Res* 1998; 84: 544-548.
112. De Sa' AG, Cerqueira AMF, O'dwyer LH et al. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected Brazilian dogs. *Int J Appl Res Vet Med* 2006; 4: 163-168.
113. Muhlnickel CJ, Jefferies R, Ryan UM, Irwin PJ. *Babesia gibsoni* infection in three dogs in Victoria. *Aust Vet J* 2002; 80: 606-610.
114. Jefferies R, Ryan UM, Muhinickel CJ, Irwint PJ. Two Species of Canine Babesia in Australia: detection and characterization by PCR. *J Parasitol* 2003; 89: 409-412.
115. Inokuma H, Yoshizaki Y, Matsumoto K et al. Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. *Vet Parasitol* 2004; 121: 341-346.
116. Martin AR, Dunstan RH, Roberts TK, Brown GK. *Babesia canis vogeli*: a novel PCR for its detection in dogs in Australia. *Exp Parasitol* 2006; 112: 63-65.
117. Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. Development and evaluation of a semi-nested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4172-4177.
118. Duarte SC, Linhares GF, Romanowsky TN, da Silveira Neto OJ, Borges LM. Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. *Vet Parasitol* 2008; 152(1-2): 16-20.
119. Matsuu A, Ono S, Ikadai H et al. Development of a SYBR green real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) DNA. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 569-573.
120. Costa LM Jr, Zahler-Rinder M, Ribeiro MF et al. Use of a Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis*. *Vet Parasitol* 2012; 188(1-2): 160-163.

121. Schaarschmidt D, Trächsel M, Achermann R et al. Importance of PCR for the diagnostics of canine babesiosis. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2006; 148: 633-640.
122. Adaszek L, Winiarczyk S. Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. *Vet Parasitol* 2008; 152: 235-241.
123. Skotarczak B. Babesiosis as a disease of people and dogs. Molecular diagnostics: a review. *Vet Med Czech* 2008; 53(5): 229-235.
124. Müller H, Aysul N, Liu Z et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid diagnosis of *Babesia canis* infections. *Transbound Emerg Dis* 2010; 57(1-2): 63-65.
125. Gökçe E, Kırmızıgül AH, Taşçı GT et al. Köpeklerde *Babesia canis canis*'in klinik ve parazitolojik olarak tespiti: Türkiye'den ilk rapor. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012; BASKIDA.
126. Aysul N, Ural K, Ulutaş B, Eren H, Karagenç T. First detection and molecular identification of *Babesia gibsoni* in two dogs from the Aydın Province of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 2013; 37: 226-229.
127. Dagnone AS, de Morais HS, Vidotto MC, Jojima FS, Vidotto O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Vet Parasitol* 2003; 117: 285-290.
128. de Castro MB, Machado RZ, de Aquino LP, Alessi AC, Costa MT. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet Parasitol* 2004; 119: 73-86.
129. Rikihisa Y, Ewing SA, Fox JC et al. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. *J Clin Microbiol* 1992; 30:143-148.
130. Groves MG, Dennis GL, Amyx HL, Huxsoll DL. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am J Vet Res* 1975; 36: 937-940.
131. Lewis GE, Ristic Jr M, Smith RD, Lincoln T, Stephenson EH. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. *Am J Vet Res* 1977; 38: 1953-1955.
132. Aguirre E, Sainz A, Dunner S et al. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Vet Parasitol* 2004; 125: 365-372.
133. Ewing SA. Geographic distribution and tick transmission of *Ehrlichia canis*. *J Med Entomol* 1972; 9: 597-598.
134. Inokuma H, Beppu T, Okuda M, Shimada Y, Sakata Y. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. *Vet Parasitol* 2003; 115: 343-348.

135. Keefe TJ, Holland CJ, Salyer PE, Ristic M. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. J Am Vet Med Assoc 1982; 181: 236-238.
136. Stephenson EH, Ristic M. Retrospective study of an *Ehrlichia canis* epizootic around Phoenix, Arizona. J Am Vet Med Assoc 1978; 172: 63-65.
137. Kuehn NF, Gaunt SD. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. J Am Vet Med Assoc 1985; 186: 355-358.
138. Woody BJ, Hoskins JD. Ehrlichial diseases of dogs. Vet Clin N Am Small Anim Pract 1991; 21: 75-98.
139. Warner CK, Dawson JE. Genus and species-level identification of *Ehrlichia* species by PCR and sequencing. In: Persing DH (ed.), PCR protocols for emerging infectious diseases. ASM Press, Washington, DC 1996: p 100-105.
140. Güneş T, Poyraz Ö, Babacan A. Sinop yöresinde, klinik olarak sağlıklı görülen köpeklerde *Ehrlichia canis* ve *Rickettsia conorii*'nin seroepidemiolojik araştırılması. Cumhuriyet Tıp Derg 2012; 34: 17-22.
141. Aslantas O, Kilic S, Caya H. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* antibodies in Turkey. Indian Veterinary Journal 2005; 82(12): 1246-1247.
142. Icen H, Sekin S, Simsek A et al. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* infection in dogs from Diyarbakir in Turkey. Asian J Anim Vet Adv 2011; 6(4): 371-378.
143. Cihan H, Temizel EM, Davoust B. Silent threat: subclinical canine monocytic ehrlichiosis in stray dogs in Turkey. U Ü Vet Fak Derg 2010; 29(2): 15-19.
144. Tuna GE, Ulutas B. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs. Lucrari Stiintifice-Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara 2009; 42(1): 160-164.
145. Yağci BB, Duru SY, Yildiz K, Öcal N, Gazyağci AN. The spread of canine monocytic ehrlichiosis in Turkey to central Anatolia. Isr J Vet Med 2010; 65(1): 15-18.
146. Aysul N, Ural K, Cetinkaya H et al. Doxycycline-chloroquine combination for the treatment of canine monocytic ehrlichiosis. Acta Sci Vet 2012; 40(2): 1031.
147. Neer TM, Breitschwerdt EB, Greene RT, Lappin MR. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM. J Vet Intern Med 2002; 16: 309-315.
148. Stuen S. *Anaplasma phagocytophilum*-the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. Vet Res Commun 2007; 31(Suppl 1): 79-78.
149. Engvall EO, Petterson B, Person M, Artusson K, Johansson KE. A 16S rRNA-based PCR assay for detection and identification of granulocytic *Ehrlichia* species in dogs, horses, and cattle. J Clin Microbiol 1996; 34: 2170-2174.

150. Cohn LA. Ehrlichiosis and related infections. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 2003; 33: 863-884.
151. Sirigireddy KR, Ganta RR. Multiplex detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species pathogens in peripheral blood by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2005; 7: 308-316.
152. Lester SJ, Breitschwerdt EB, Collis CD, Hegarty BC. *Anaplasma phagocytophilum* infection (granulocytic anaplasmosis) in a dog from Vancouver Island. *Can Vet J* 2005; 46: 825-827.
153. Kirtz G, Leidinger E, Moser V. Canine granulocytäre Ehrlichiose (CGE) bei einem Hund in Österreich. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 2000; 87: 241-246.
154. Kirtz G, Meli M, Leidinger E et al. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog: identifying the causative agent using PCR. *J Small Anim Pract* 2005; 46: 300-303.
155. Pusterla N, Huder J, Wolfensberger C et al. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2307-2309.
156. Aktas M, Vatansever Z, Altay K, Aydin MF, Dumanli N. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from Turkey. *T Roy Soc Trop Med H* 2010; 104(1): 10-15.
157. Sen E, Uchishima Y, Okamoto Y et al. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks from Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of north-western Turkey. *Ticks Tick-Borne Dis* 2011; 2(2): 94-98.
158. Aktas M, Altay K, Ozubek S, Dumanli N. A survey of ixodid ticks feeding on cattle and prevalence of tick-borne pathogens in the Black Sea region of Turkey. *Vet Parasitol* 2012; 187(3-4): 567-71.
159. Caturegli P, Asanovich KM, Walls JJ et al. ankA: an *Ehrlichia phagocytophila* group gene encoding a cytoplasmic protein antigen with ankyrin repeats. *Infect Immun* 2000; 68: 5277-5283.
160. Massung RF, Owens JH, Ross D et al. Sequence analysis of the ank gene of granulocytic ehrlichiae. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2917-2922.
161. Park J, Kim KJ, Choi KS, Garb DJ, Dumler JS. *Anaplasma phagocytophilum* AnkA binds to granulocyte DNA and nuclear proteins. *Cell Microbiol* 2004; 6: 743-751.
162. O'Dwyer LH. Brazilian canine hepatozoonosis. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(3): 181-193.
163. Baneth G, Weigler B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *J Vet Intern Med* 1997; 11: 365-370.
164. Gavazza A, Bizzeti M, Papini R. Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. *Rev Med Vet* 2003; 154: 565-571.

165. Kiral F, Karagenc T, Pasa S, Yenisey C, Seyrek K. Dogs with *Hepatozoon canis* respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide. *Vet Parasitol* 2005; 131(1-2): 15-21.
166. Voyvoda H, Pasa S, Uner A. Clinical *Hepatozoon canis* infection in a dog in Turkey. *J Small Anim Pract* 2004; 45: 613-617.
167. Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd* 1984; 70: 271-274.
168. Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 417-431.
169. Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean J Parasitol* 2003; 41(1): 1-16.
170. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 1998; 28(9): 1473-1478.
171. Peters M, Wagner F, Schares G. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. *Parasitol Res* 2000; 86: 1-7.
172. Dubey JP, Schares G. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol* 2006; 140: 1-34.
173. Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 2004; 34: 159-161.
174. King JS, Brown GK, Jenkins DJ et al. Oocysts and high seroprevalence of *Neospora caninum* in dogs living in remote Aboriginal communities and wild dogs in Australia. *Vet Parasitol* 2012; 187(1-2): 85-92.