

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TAVUKLARDA *DERMANYSSUS GALLINAE*'NİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE *SALMONELLA*
SPP. YÖNÜNDEN VEKTÖRLÜK POTANSİYELLERİNİN
MOLEKÜLER OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Zekiye KOÇER**

**Danışman
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2014-5508 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Nisan 2016
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Zekiye KOÇER

İmza :



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

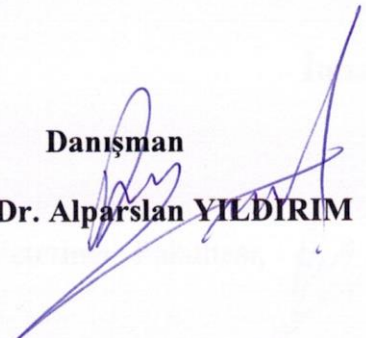
“Tavuklarda *Dermanyssus gallinae*’nin Moleküler Karakterizasyonu ve *Salmonella* spp. Yönünden Vektörlük Potansiyellerinin Moleküler Olarak Araştırılması”, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Tezi Hazırlayan

Zekiye KOÇER

Danışman



Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM



Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM danışmanlığında **Zekiye KOÇER** tarafından hazırlanan “**Tavuklarda *Dermanyssus gallinae*’nin Moleküler Karakterizasyonu ve *Salmonella* spp. Yönünden Vektörlük Potansiyellerinin Moleküler Olarak Araştırılması**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Parazitoloji** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

08/04/2016

JÜRİ :**İmza**

Danışman: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM (ERÜ Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

Üye: Prof. Dr. Abdullah İNCİ (ERÜ Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

Üye: Doç. Dr. Ramazan ADANIR (MAKÜ Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı Anabilim Dalı, Burdur)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 05.05.2016...tarih ve...729.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

05/05/2016
Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Başta tez konumun seçilmesinden çalışmalarımın yürütülmesine kadar her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda sonsuz desteğiyle gelişmeme katkıda bulunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Parazitoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladığım günden bu yana desteğini gördüğüm değerli hocalarım Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdullah İNCİ ve Doç. Önder DÜZLÜ ile öğretim elemanları Öğr. Gör. Dr. Zuhâl ÖNDER ve Araş. Gör. Arif ÇİLOĞLU'na, saha materyalimin elde edilmesi esnasında her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Kadir Semih GÜMÜŞSOY'a, çalışma süresince malzeme bazında TYL-2014-5508 kodlu proje ile destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın her aşamasında birçok fedakârlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan aileme teşekkürü borç bilirim.

**TAVUKLARDA *DERMANYSSUS GALLINAE*'NİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU VE *SALMONELLA* SPP. YÖNÜNDEN VEKTÖRLÜK
POTANSİYELLERİNİN MOLEKÜLER OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Nisan 2016
Danışman: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

ÖZET

Bu çalışmada, Kayseri yöresinde bir yumurta tavukçuluğu işletmesinde enfestasyona yol açan *Dermanyssus gallinae* popülasyonuna ait nesillerin filogenetik yapılanmaları ve *Salmonella* spp. enfeksiyonlarının nakli açısından risk potansiyelleri moleküler olarak araştırılmıştır. Araştırma materyalini 2014 yılının Temmuz ayında ilgili işletmeden laboratuvara getirilmiş 8 adet ölü tavuk üzerindeki akar örnekleri oluşturmuştur. Tavukların üzerinden ve konuldukları poşetler içerisinden toplam 2750 adet akar örneği toplanmıştır. Toplanan akarlar morfolojik olarak *D. gallinae* olarak tanımlanmış ve gelişim dönemlerine göre 1920 adet ergin (%69,81), 785 adet nimf (%28,45) ve 45 adet larva (%1,63) olmak üzere kategorize edilmiştir. Moleküler ve filogenetik analizler için mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mt-COI) ve ribozomal internal transcribed spacer (ITS+) hedef gen bölgeleri olarak belirlenmiştir. Her gelişim dönemini kapsayacak şekilde örneklerden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve akabinde genomik DNA izolatlarının ilgili gen bölgeleri yönünden primer çiftleriyle PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Her iki gen bölgesi için ergin, nimf ve larva dönemlerine ait toplam 7'şer izolata ait ampikon sekans ve filogenetik analizler için klonlanmış ve plazmid pürifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Plazmidler vektör spesifik primerlerle sekans analizine tabii tutulmuş ve hedef gen bölgesi dizilimleri elde edilmiştir. Mt-COI sekans analizleri 6 yeni haplotipin varlığını ortaya koymuş olup bu haplotiplerin E, F ve A haplogruplarında yer aldıkları ve aralarında ortalama %11,3 genetik farklılık bulunduğu saptanmıştır. ITS+ filogenisine göre izolatlar arasındaki genetik farklılık %0,3 belirlenmiş olup filogenetik çözünürlük düşük olmakla birlikte izolatların 3 filogenetik grup (Tip 1-3) içerisinde kümelendikleri tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca ITS+ gen bölgesi analizleriyle *D. gallinae* olduğu konfirme edilen bir izolatın mt-COI sekans analizleriyle sığır DNA'sına ait olduğu saptanmış ve barınak ortamında *D. gallinae*'nin sığırlardan kan emerek beslenebildiğine dair özgün veri sağlanmıştır. Diğer yandan

Çalışmada *D. gallinae* gelişim dönemleri bazında oluşturulmuş toplam 38 genomik DNA havuzunun 9 (5 ergin, 3 nimf ve 1 larva havuzu) ’unda (%23,7) *Salmonella* spp. 16S rRNA gen bölgesini parsiyel olarak amplifiye eden primerlerle PCR analizleri sonucu pozitiflik belirlenmiştir. Pozitif belirlenen ergin havuzlarına ait iki izolat 16S rRNA sekans ve blastn analizleri sonucu *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis olarak karakterize edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye’de ilk kez *D. gallinae* nesillerinin moleküler karakterizasyonları sağlanmış ve filogenetik yapılanmaları ortaya konmuş ve *Salmonella* enfeksiyonlarında vektörlük potansiyelleri açısından oluşturdukları risk faktörleri üzerine özgün bilimsel veriler sağlanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Dermanyssus gallinae*, Tavuk, Moleküler karakterizasyon, Vektörlük potansiyeli, *Salmonella* spp.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *DERMANYSSUS GALLINAE* IN CHICKENS AND MOLECULAR INVESTIGATION OF THEIR POTENTIAL AS VECTORS OF *SALMONELLA* SPP.

**Erciyes University, Graduate School of Health Science
Department of Veterinary Parasitology
M.Sc. Thesis, April 2016
Supervisor: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

ABSTRACT

Phylogenetic constructions and risk potentials for the transmission of *Salmonella* spp. of the lineages belong to *Dermanyssus gallinae* population which caused infestation on a private poultry farm where located in Kayseri region were molecularly investigated in this study. The mite specimens found on the 8 died hens which were brought to the laboratory in August 2016 from the related enterprise were constituted the research material. Totally 2750 mite specimens were collected from the hens and the nylon bags in which the hens' individually placed in. The collected mites were morphologically identified as *D. gallinae* and categorized by their development stages as 1920 adult (69.81%), 785 nymph (28.45%) and 45 larvae (1.63%). Mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mt-COI) and ribosomal internal transcribed spacer (ITS+) were determined as the target gene regions for molecular and phylogenetic analyses. Genomic DNA isolations were performed on the specimens which include every development stages and PCR analyses of the obtained isolates were done with the primer pairs specific to the target gene regions. Amplicons from 7 isolates belong to the adult, nymph and larvae stages for both gene regions were cloned and plasmids purifications were performed. The obtained plasmids were sequenced with the vector specific primer pairs and the sequences of the target gene regions were obtained. The mt-COI sequence analyses revealed 6 new haplotypes and these haplotypes were designated in the haplogroups E, F and A. The mean genetic diversity among the obtained haplotypes were determined as 11.3%. The mean genetic diversity among the isolates was designated as 0.3% based on ITS+ phylogeny and the isolates were clustered in 3 phylogenetic group (Type 1-3) with a low phylogenetic resolution. In addition one isolate that was confirmed as *D. gallinae* was determined as belong to cattle DNA with the sequence analyses of mt-COI in this study and this result proved an unique data for blood feed of *D. gallinae* from cattle in natural conditions. On the other hand 9 (23.7%) (5 adults, 3 nymph and 1 larvae) out of totally 38

genomic DNA pools which were constituted from the development stages of *D. gallinae* were found to be positive for *Salmonella* spp. in PCR with the primers that amplify the partial 16S rRNA gen region. Two positive isolates belong to the adult pools were characterized as *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis with the sequence and blastn analyses of the 16S rRNA.

In conclusion, molecular characterization and phylogenetic construction of *D. gallinae* lineages were provided for the first time in Turkey with this study. Furthermore unique scientific data were obtained on the risk factors for vector potential of *D. gallinae* in the *Salmonella* infections.

Key words: *Dermanyssus gallinae*, Hen, Molecular characterization, Vector potential, *Salmonella* spp.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER	x
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 <i>DERMANYSSUS GALLINAE</i> 'NİN TAKSONOMİSİ.....	3
2.2 <i>DERMANYSSUS GALLINAE</i> 'NİN MORFOLOJİSİ.....	4
2.3 <i>DERMANYSSUS GALLINAE</i> 'NİN BİYOLOJİSİ.....	12
2.4 <i>DERMANYSSUS GALLINAE</i> ENFESTASYONLARININ EPİDEMİYOLOJİSİ.....	14
2.4.1 Dünyadaki Yayılış	15
2.4.2 Türkiye'deki Yayılışı	15
2.5 <i>DERMANYSSUS GALLINAE</i> ENFESTASYONLARINDA KLİNİK VE PATOGENEZ	16
2.6 <i>DERMANYSSUS GALLINAE</i> 'NİN TANISI	17
2.6.1 Ayırıcı Tanı	18
2.7 KORUNMA VE KONTROL	19
2.7.1 Kimyasal Kontrol Metodları.....	19

2.7.2	Akarisit Direnci	21
2.7.3	Aşı Denemeleri.....	22
2.7.4	Fiziksel Kontrol Yöntemleri.....	23
2.7.5	Biyolojik ve Alternatif Mücadele Yöntemleri.....	23
2.8	<i>DERMANYSSUS GALLINAE</i> 'NİN VEKTÖRLÜK POTANSİYELİ.....	24
2.8.1	<i>Salmonella</i> Enfeksiyonları	25
2.9	<i>DERMANYSSUS GALLINAE</i> ÜZERİNE MOLEKÜLER VE FİLOGENETİK ÇALIŞMALAR.....	27
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1	ARAŞTIRMA MATERYALİ VE AKAR ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI	29
3.2	MORFOLOJİK İDENTİFİKASYON.....	30
3.3	MOLEKÜLER ANALİZLER	30
3.3.1	Genomik DNA İzolasyonu	30
3.3.2	Mt-COI Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	31
3.3.3	Ribozomal ITS+ gen bölgesinin amplifikasyonu	32
3.3.4	<i>Salmonella</i> spp. 16S rRNA Geninin Amplifikasyonu.....	33
3.3.5	PCR Ürünlerinin Elektroforezi.....	34
3.3.6	Klonlanma ve Plazmid Pürifikasyonu	34
3.3.7	Sekans ve Filogenetik Analizler	38
4.	BULGULAR	41
4.1	MORFOLOJİK İDENTİFİKASYON SONUÇLARI.....	41
4.2	MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI	43
4.2.1	Mt-COI Gen Bölgesi Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları	43
4.2.2	Mt-COI Gen Bölgesi Filogenetik Analiz Sonuçları	48
4.2.3	Ribozomal ITS+ Gen Bölgesi Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları	52

4.2.4 ITS+ Gen Bölgesi Filogenetik Analiz sonuçları	56
4.2.5 Salmonella spp. 16S rRNA Gen Bölgesi Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları.....	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	63
6. KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ	81

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 <i>D. gallinae</i> 'nin sistematikteki yeri	4
Tablo 2.2 <i>D. gallinae</i> ile ilgili viral ve bakteriyel patojenler (2, 68).....	24
Tablo 4.1 Ölü tavuklar üzerinde belirlenen <i>D. gallinae</i> akarlarının gelişim dönemlerine göre dağılımı ...	41
Tablo 4.2 Mt-COI gen bölgesine göre karakterize edilen izolatların tür, DNA izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları	47
Tablo 4.3 Mt-COI gen bölgesine göre <i>D. gallinae</i> olarak karakterize edilen izolatların nükleotid kompozisyonları	48
Tablo 4.4 Mt-COI gen bölgesine filogenetik analize dahil edilen izolatların pairwise identiklik oranları	50
Tablo 4.5 ITS+ gen bölgesine göre karakterize edilen izolatların tür, DNA izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları	55
Tablo 4.6 ITS+ gen bölgesine göre <i>D. gallinae</i> olarak karakterize edilen izolatların nükleotid kompozisyonları	55
Tablo 4.7 ITS+ gen bölgesine filogenetik analize dahil edilen izolatların pairwise identiklik oranları	57
Tablo 4.8 <i>Salmonella</i> spp. yönünden incelenen <i>D. gallinae</i> genomik DNA havuzlarında belirlenen pozitiflikler	59
Tablo 4.9 16S rRNA gen bölgesine göre karakterize edilen <i>Salmonella</i> izolatlarının tür, DNA izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları	61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Dermanyssus gallinae 1: erkek, 2: dişi.....	4
Şekil 2.2 Dermanyssus gallinae gelişim dönemleri (ergin, nimf, yumurta)	5
Şekil 2.3 Kan emmiş (a) ve beslenmemiş (b) <i>D. gallinae</i>	6
Şekil 2.4 Ergin, Dişi, <i>D.gallinae</i> ventral görünüşü	6
Şekil 2.5 Dişi <i>D. gallinae</i> , 1	7
Şekil 2.6 Dişi <i>D. gallinae</i> , 2	8
Şekil 2.7 Dişi <i>D. gallinae</i> , 3	9
Şekil 2.8 Dişi <i>Dermanyssus gallinae</i> , 4	10
Şekil 2.9 Dişi <i>D. gallinae</i> , 5	11
Şekil 2.10 Dişi <i>D. gallinae</i> , 6	11
Şekil 2.11 <i>D. gallinae</i> : farklı aşamalardan genel görünüm.	12
Şekil 2.12 <i>D. gallinae</i> 'nin biyolojik döngüsü	14
Şekil 2.13 Tavuktan kan emen <i>D. gaillinae</i>	18
Şekil 2.14 Dişi <i>Ornithonyssus silviarum</i>	19
Şekil 3.1 Tavuk üzerinde bulunan akarlar	29
Şekil 3.2 pJET1.2/blunt Cloning Vector Haritası.....	35
Şekil 3.3 Aval ve XbaI (Thermo Scientific) enzimlerinin bağlanma noktaları	38
Şekil 4.1 Ergin <i>D. gallinae</i> Dorsal (A: Dişi, B: Erkek) ve Ventral Görüntüsü (C: Dişi, D: Erkek)	42
Şekil 4.2 <i>D. gallinae</i> Nimfleri Dorsal (A: Protonimf; B: Deutonymf) Ventral Görüntüsü (C: Deutonymf)	42
Şekil 4.3 <i>D. gallinae</i> Larvası Ventral Görüntüsü	43
Şekil 4.4 <i>D. gallinae</i> örneklerine ait genomik DNA izolatlarının mt-COI gen bölgesini amplifiye eden COX1F ve COX1R primerleri ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü	43
Şekil 4.5 Sekans analizleri için seçilen bazı izolatların mt-COI gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel purifiye edilen örneklerin jel elektroforezde görünümü.	44
Şekil 4.6 LB katı besi yerinde üreyen 1. ve 2. inkübasyon basamakları sonucu oluşan koloniler	45
Şekil 4.7 Transforme hücrelerde mt-COI gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu ampliconların jel agarozda görünümü.	45

Şekil 4.8 Safılaştırılan plazmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu insert mt-COI gen bölgesi fragmentlerinin agaroz jelde görünümü.	45
Şekil 4.9 Saptananmt-COIizolatlarına ait nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları	46
Şekil 4.10 Mt-COI gen bölgesi amplifikasyonunda kullanılan COX1F ve COX1R primerlerinin sığır mt-COX1 gen bölgesinin amplifikasyonu açısından uyumluluğu	47
Şekil 4.11 <i>D. gallinae</i> izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) analizine göre filogenetik ilişkileri..	51
Şekil 4.12 <i>D. gallinae</i> örneklerine ait genomik DNA izolatlarının ITS+ gen bölgesini amplifiye eden ITSF ve ITSr primerleri ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampikonların jel elektroforezde görünümü.....	52
Şekil 4.13 Sekans analizleri için seçilen bazı izolatların ITS+ gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel pürifiye edilen örneklerin jel elektroforezde görünümü.	52
Şekil 4.14 Transforme hücrelerde ITS-2 gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu ampikonların jel agarozda görünümü.	53
Şekil 4.15 Safılaştırılan plasmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu insert ITS+ gen bölgesi fragmentlerinin agaroz jelde görünümü.	53
Şekil 4.16 SaptananITS+izolatlarına ait nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları.....	54
Şekil 4.17 <i>D. gallinae</i> izolatlarının ITS+ gen bölgesi Maximum Likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri..	58
Şekil 4.18 <i>D. gallinae</i> gelişim dönemlerinden oluşturulmuş genomik DNA havuzlarında <i>Salmonella</i> spp. 16S rRNA gen bölgesini amplifiye eden 16SF ve 16SR primerleri ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampikonların jel elektroforezde görünümü	59
Şekil 4.19Sekans analizleri için seçilen <i>Salmonella</i> spp. izolatlarının 16S rRNA gen bölgesi ampikonlarının jel pürifikasyonu sonrası agaroz jelde görünümleri.	60
Şekil 4.20 Safılaştırılan plasmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu insert 16S rRNA gen bölgesi fragmentlerinin agaroz jelde görünümü.	60
Şekil 4.21 Çalışmada belirlenen izolatların (kırmızı ve kalın karakter) diğer <i>Salmonella</i> tür/alt türlerine ait izolatlarla birlikte filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri.	62

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Halk arasında yanlışlıkla “kırmızı tavuk biti” olarak da adlandırılan *Dermanyssus gallinae* esasen bit olmayıp bir akardır. Konaklarından geceleri kan emen *D. gallinae*, başlangıçta beyaz veya açık renkli iken kan emdikçe rengi koyulaşmakta ve açık kırmızıdan siyaha kadar değişmektedir. “Tünek akarı” veya “kırmızı kanatlı akarı” da denilen bu ektoparazitin yol açtığı enfestasyon, kanatlılarda yaygın olarak görülmekte ve özellikle endüstriyel kanatlı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde sebep olduğu verim kayıpları ve ölümlerle büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

D. gallinae enfestasyonu, dünya genelinde olduğu gibi, Türkiye’de de endüstriyel kanatlı işletmelerinde daha çok da yumurta tavukçuluğu yapılan çiftliklerde yaygınlık göstermektedir. Enfeste tavuk çiftliklerinde özellikle yumurta verimindeki kayıplara enfestasyona karşı acaricidlerle verilen mücadele maliyetleri de ilave edildiğinde ekonomik kayıplar daha da artmaktadır. Diğer yandan *D. gallinae*, bir dış parazit olarak bizzat her türlü kanatlı işletmesinde konaklarından kan emerken yol açtığı anemi ve verdiği huzursuzlukla yemden yararlanma kapasitesini azaltmakta ve dolayısıyla sürüde bağışıklığın zayıflamasına ve bu sayede muhtemel enfeksiyonlara predispozisyon oluşturmaktadır.

D. gallinae tüm Dünyada yaygınlık göstermesine karşın günümüze kadar nükleotid sekanslarına bağlı genetik diversite çalışmalarının sınırlı olarak bazı Avrupa ülkeleri, Amerika Birleşik Devletleri, Brezilya, Avustralya ve Japonya’daki popülasyonlar üzerine yapıldığı görülmektedir. Söz konusu coğrafyalarda genetik çeşitliliğin araştırılmasında mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI), 16S rRNA ve nuclear internal transcribed spacers (ITS+) gen bölgeleri başlıca hedef gen bölgeleri olmuştur. Bu filogenetik çalışmalar sonucunda bu akarların ülke içinde ve ülkeler arasında göç gösterdiği epidemiyolojik bazda belirlenmiştir. Türkiye’de de *D. gallinae*’nin yaygınlık gösterdiği bilinmekte olup günümüze kadar bu akarlarla ilgili genetik çeşitlilik ve filogenetik yapılanma üzerine çalışmalar yapılmamıştır. Moleküler epidemiyoloji

kapsamında bu akarların genetik çeşitliliklerinin ortaya çıkarılması, özellikle akarisit dirençliliği de göz önüne alındığında kontrol ve mücadele stratejilerinin belirlenmesinde tüm Dünyada olduğu gibi ülkemiz içinde oldukça önem arz etmektedir. Bu tez çalışması ile yoğun enfeste belirlenen tavuklardan toplanmış *D. gallinae* örneklerinden izole edilmiş genomik DNA izolatları mt-COI ve ITS+ gen bölgelerine göre karakterize edilmiş ve filogenetik yapılanmaları incelenerek Dünyadaki mevcut genotiplerle ilişkileri ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar, Türkiye’de *D. gallinae* enfestasyonları üzerine ilk moleküler filogenetik verileri sağlamıştır.

D. gallinae, kanatlı sektöründe yol açtığı anemi tablosuyla doğrudan ölümlere sebep olmasının yanında ayrıca bakteri ve virüsler başta olmak üzere çeşitli patojenlerin kanatlılara mekanik ve/veya biyolojik naklinde de önemli ve potansiyel bir vektör olduğu güncel çalışmalarla ortaya konmuştur (1, 2). Bu patojenler arasında *Salmonella* spp. nin yol açtığı enfeksiyonlar, oldukça önem arz etmektedir. Günümüze kadar dünyada *D. gallinae* ve çeşitli patojenler için vektörlük potansiyelleri üzerine yapılmış moleküler tabanlı araştırmaların sınırlı olduğu, Türkiye’de ise mevcut olmadığı dikkati çekmiştir. Güncel veriler ışığında, bu tez çalışmasında Türkiye’de endüstriyel kanatlı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde de sıklıkla görülen *Salmonella* spp. enfeksiyonlarının bulaşma dinamikleri arasında *D. gallinae* enfestasyonlarının biyolojik ve/veya mekanik vektörlük potansiyelleri açısından risk oluşturduğu hipotez edilmiş ve *Salmonella* spp.’ye bağlı ölümlerin rapor edildiği bir çiftlikten Anabilim Dalı laboratuvarına intikal ettirilmiş olan henüz ölmüş tavuklarda toplanan çok sayıdaki *D. gallinae* akarlarında gelişim dönemlerine göre söz konusu patojen moleküler olarak araştırılmış ve bulunan izolatların sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kanatlı üzerindeki görünüşüne göre kırmızı akar ya da tavuk akarı olarak adlandırılan *Dermanyssus gallinae*, kanatlı hayvanlarda sıkça karşılaşılan dış parazitlerden biridir (3). Tavukların dışında bu akarın hindi, güvercin, kanarya ve diğer kafes kuşları, sülün ile evcil memelilerin yanında insanları da enfeste ettiği ve kan emebildiği bildirilmiştir (4, 5). Kanatlı hayvanların derisinde yaşamını sürdüren bu ektoparazitin, dış kulak yoluna da girdiği gündüzleri kümes, kafes, mesken ve barınakların pencere aralıklarına, kapı aralıklarına, duvarların yarık ve çatlaklarına, yemlik ve sulakların altlarına, tavan aralıklarındaki kuytu yerlere gizlendikleri bildirilmektedir (6).

D. gallinae, kanatlılarda bulunan akarlar içinde en yaygın türlerin başında gelir ve Dünyanın her yerinde yayılış gösterdiği gibi, Türkiye’de de kanatlı sektöründe oldukça yaygın görülmektedir (6).

2.1 *DERMANYSSUS GALLINAE*’NİN TAKSONOMİSİ

Dermanyssus galline, ilk kez De Geer tarafından 1778 tarif edilmiştir. Dugès 1834’de *D. gallinae*’nin alt türlerini de kapsayan beş yeni *Dermanyssus* türünü tarif etmiştir (7). Yıllar geçtikçe yeni araştırmalarla tür sayısında büyük farklılıklar ortaya çıkmıştır: 56’dan fazla tür bu cinse dahil edilmiş ancak 1978 yılında Moss (8) son düzenlemeyi yaptığında 18 tür kalmıştır. Son olarak 2007 yılında *Dermanyssus* cinsindeki akarlar toplam 23 tür içerisinde klasifiye edilmiştir (7). Güncel olarak National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy veri tabanına göre *D. gallinae*’nin sistematikteki yeri Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1D. *gallinae*'nin sistematikteki yeri

Sınıflandırma
Alem: Animalia C. Linnaeus, 1758
Şube: Arthropoda von Siebold, 1848
Alt Şube: Chelicerata Heymons, 1901
Sınıf: Arachnida Cuvier, 1812
Alt Sınıf: Acari Leach, 1817
Dizi: Parasitiformes
Dizialtı: Mesostigmata
Aile: Dermanyssidae
Cins: <i>Dermanyssus</i> Dugès, 1834
Tür: <i>Dermanyssus gallinae</i> De Geer, 1778

2.2 *DERMANYSSUS GALLINAE*'NİN MORFOLOJİSİ

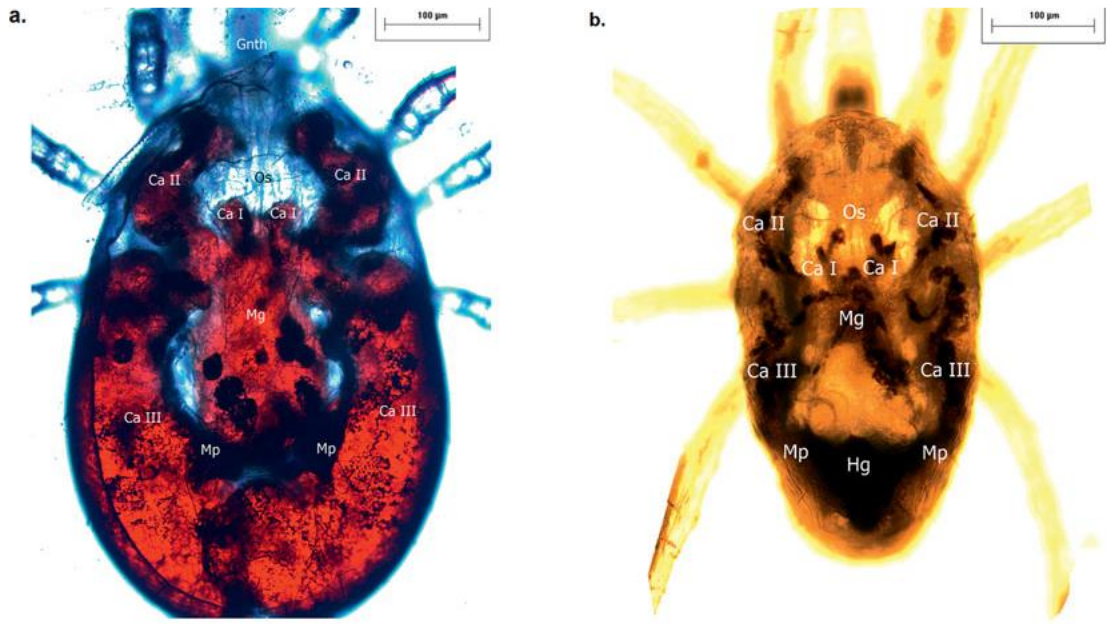
Erkekleri 0.6 mm uzunluğunda, 0.3 mm genişliğindedir (Şekil 2.1, 1). Dişileri ise 0.7-0.8 mm uzunluğunda, 0.4 mm genişliğindedir (Şekil 2.1, 2). Şeliserler erkekte makas şeklinde olup, dişide ince ve uzundur. Ergin ve nimflerde dört çift, larvalarda üç çift bacak vardır. Yumurtalarının 400×270 mikron büyüklüğünde olduğu bildirilmektedir (6). Vulva 2. koksalar arasında, ortada yer alır. Stigmalar 4. çift koksaların hizasında bulunur. Vücut oval ve ince bir kitinle kaplıdır. Üzerinde kıllar mevcuttur. Bacaklar uzundur ve uçlarında tırnaklar ve pulvilluslar bulunur (9). *D. gallinae* ergin, nimf ve yumurtalarının görünümü ayrıca Şekil 2.2'de verilmiştir.

Şekil 2.1 *Dermanyssus gallinae* 1: erkek, 2: dişi (10)

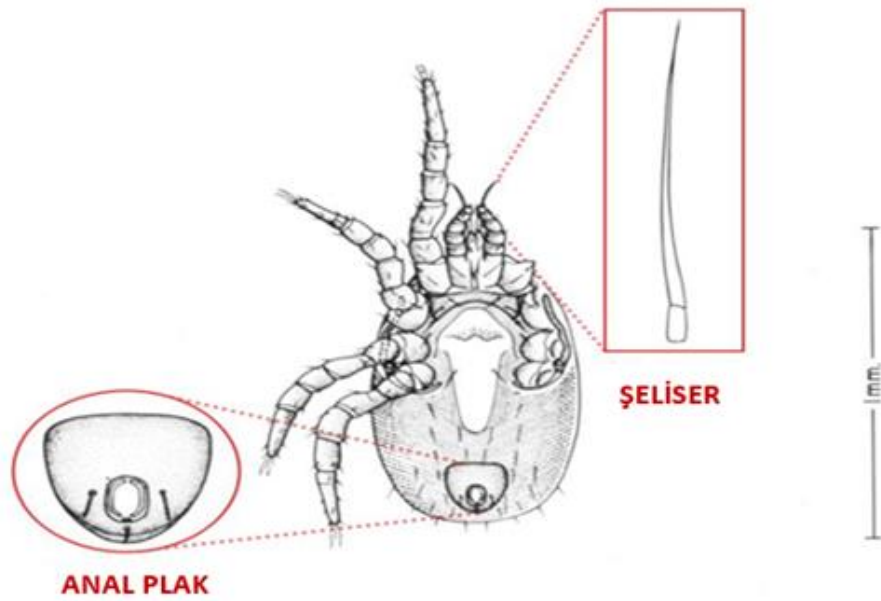


Şekil 2.2 *Dermanyssus gallinae* gelişim dönemleri (ergin, nimf, yumurta) (11)

Akarlar kan emdiği zaman kırmızı-siyah renkte, kan emmediği zaman ise beyaz renkte görülmekte (Şekil 2.3) olup, şeliserler erkeklerde makas şeklinde dişilerde ise ince ve uzun yapıdadır (Şekil 2.4) (6).



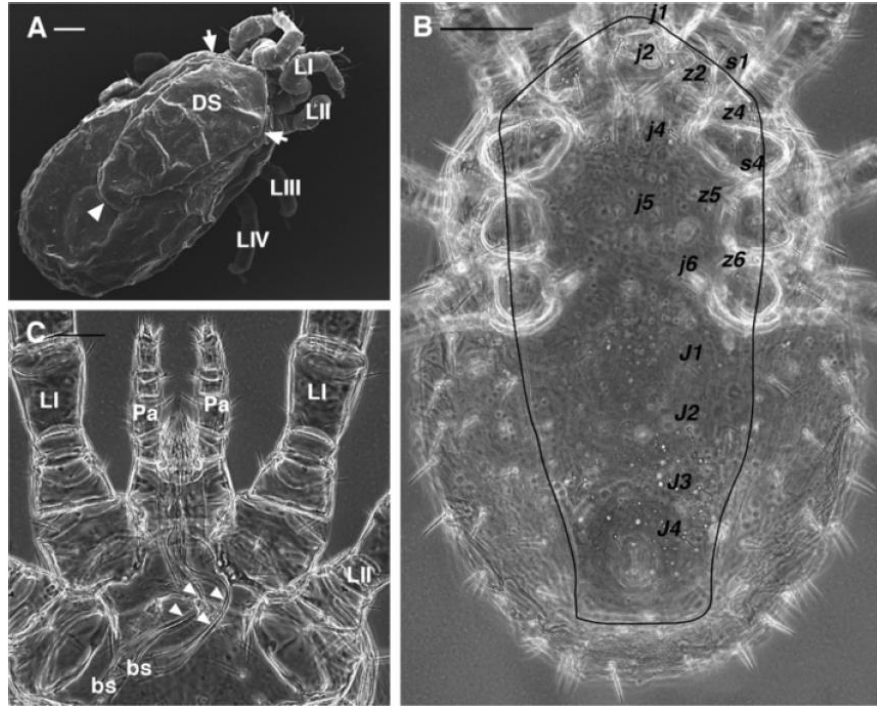
Şekil 2.3 Kan emmiş (a) ve beslenmemiş (b) *D. gallinae*(12)



Şekil 2.4 Ergin, Dişi, *D.gallinae* ventral görünüşü (6)

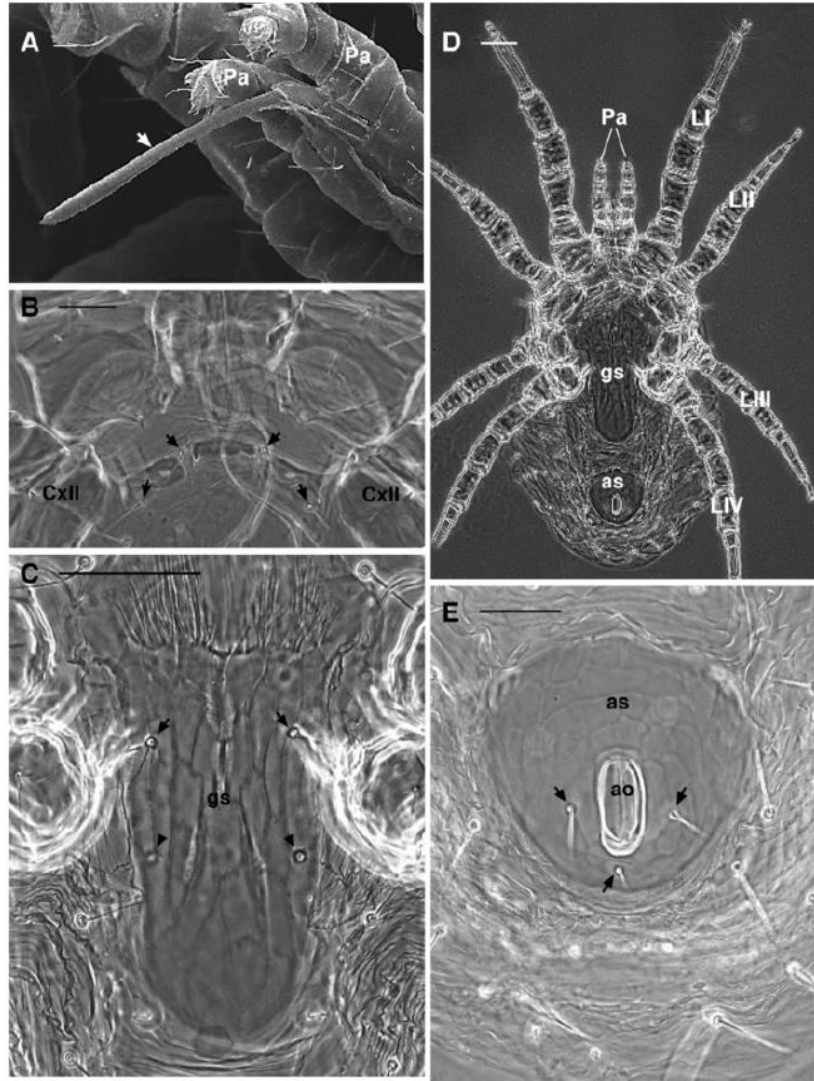
Dermanyssidae ailesinin genel özelliği aşağıdaki gibidir(13):

1. Idiosoma geniş, posterior kısım ise yuvarlaktır (Şekil 2.5A-B)
2. Bazal segment üzerindeki ikinci şeliser dişide ince uzundur (Şekil 2.5C, 2A)



Şekil 2.5 Dişi *Dermanyssus gallinae*, 1. (A) SEM görüntüsü: dorsal kılıfın kesik arka kenarı, belirgin omuzlar, geniş posterior ve yuvarlak idiosomanın genel görüntüsü. (B) Moss'a göre Dorsal kılıfın LM görüntüsü (ana hatları). (C) LM resimde vücudun ön bölgesi gösterilmektedir, basal segmentde ikinci şeliser ince ve uzundur(ok ile gösterilen). Abbr: bs, basal segmentde şeliser; DS, dorsal kılıf; LI-LIV, bacak I, II, III, IV; Pa, pedipalp. Ölçek çizgisi: 100 µm A, C; 50 µm B(13)

Genel görünüm olarak, *D. gallinae* dorsal kılıfı posterior kısımda (Şekil 2.5A-B) ve bir kesik arka kenar vardır (Şekil 2.5A-B). Şeliser uzun ve styliform şeklindedir (Şekil 2.5C-A). Sternal kılıfda seta iki çifttir (II ve III. Bacağın arasında ki sclerite) (Şekil 2.6B), ve posterior da üçüncü çift bacağın yerleşimi belirgin olarak diğerlerinden ayrılır. Genitoventral kalkan yuvarlaktır ve bir çift seta bulundurmaktadır (Şekil 2.6C-D). Anal kılıfda üç seta vardır (Şekil 2.6D-E) (13).

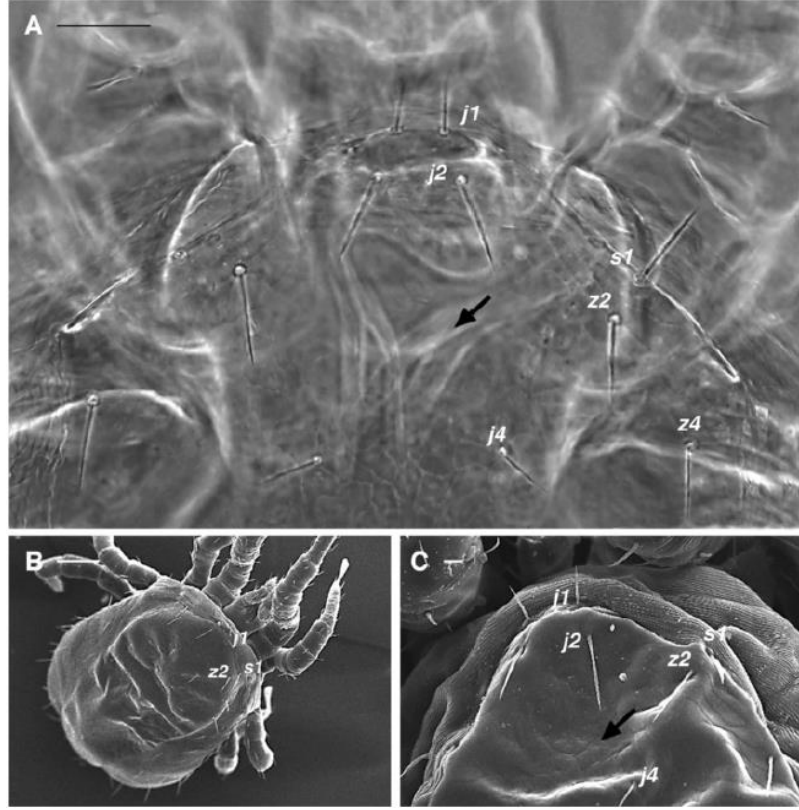


Şekil 2.6 Dişi *Dermanyssus gallinae*, 2. (A) SEM görüntüsü: stylet-benzeri ikinci şeliserin ayrıntısı (oklar). (B) LM: uzun sternal kılıfın ayrıntısı, sternal setanın iki çifti (oklar). (C) LM: bir çift seta ile genitoventral kılıfın görünümü (oklar ile) ve 1 çift epigynal por (ok). (D) LM: ventral yüze genel bakış. Genitoventral (epigynal) kılıf posteriore doğru yuvarlaktır. (E) LM: üç anal seta ile anal kılıf. Abbr: ao, anal açıklık; anal kılıf gibi; CxII, coxa II; gs, genitoventral kılıf; LI-IV, bacak I-IV; Pa, pedipalp. Ölçek çizgisi: 10 µm A; 50 µm B, C, E; 100 µm D(13)

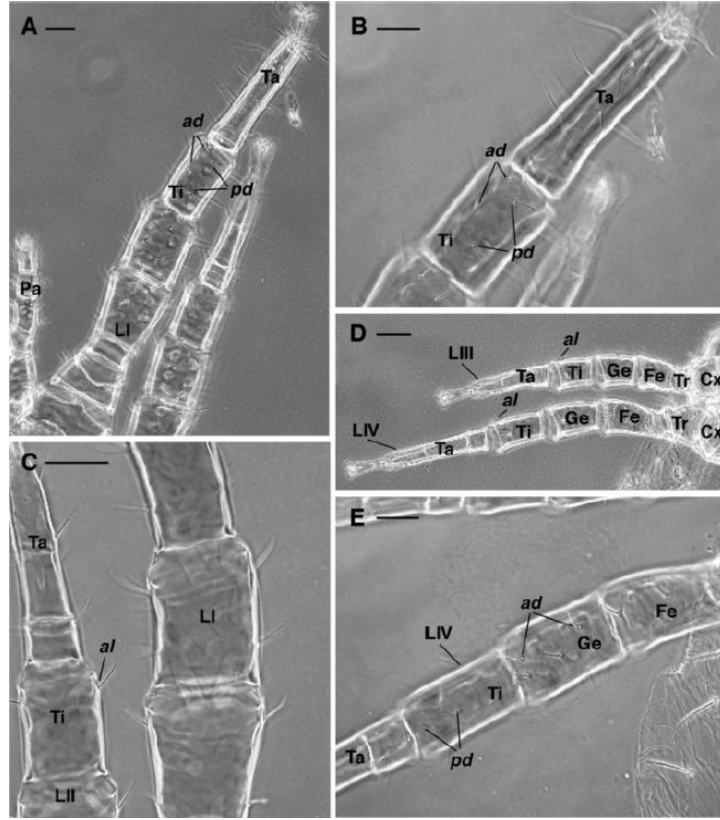
Moss'a göre (14)*Dermanyssus* cinsini aşağıdaki gibi karakterize etmiştir:

1. dorsal kılıf üzerinde seta j3 bulunmaması (Şekil 2.5B, 2.7A-C)
2. sternal kılıf daralmış (II ve III. Bacak arasındaki ventral sclerite) ve sternal setanın 1-2 çifti daha uzundur (Şekil 2.6B)
3. tibia I ad (anterodorsal) ve iki seta ile pd (posterodorsal) (Şekil 2.8A-B)
4. tibia II-IV ile 1 seta (anterolateral) (Şekil 2.8C-D)

5. her iki setada genu IV ad (anterodorsal) ve tibia IV pd (posterodorsal) (Şekil 2.8E, 2.9C).



Şekil 2.7 Dişi *D. gallinae*: türlerin belirlenmesinde kullanılan dorsal kılıf da chaetotaxy (A) LM (B), (C) SEM görüntüsü. Teşhis anahtarına göre, dorsal kılıf üzerinde j1 ve s1 dorsal kılıfı bulunurken seta j3 bulunmamaktadır. Moss'a göre Dorsal chaetotaxy [24]. Ölçek çizgisi: 50 µm A; 100 µm B; 10 µm C (13)

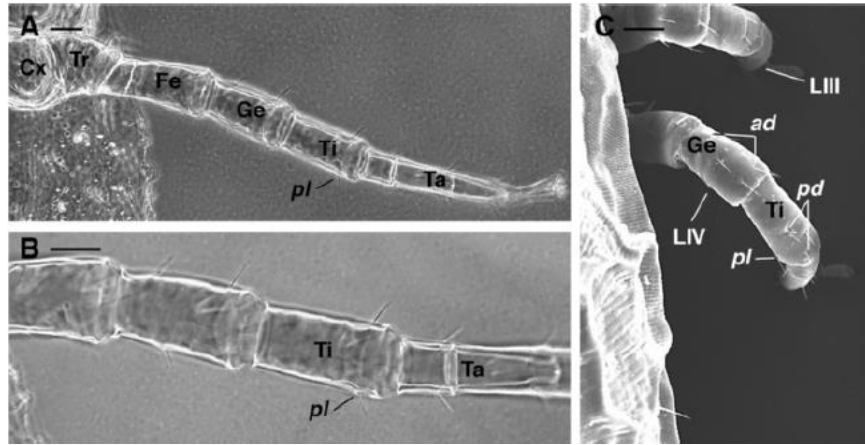


Şekil 2.8 Dişi *Dermanyssus gallinae*: bacak chaetotaxy LM. (A) tibia I ile 2 anterodorsal ve 2 posterodorsal seta. (B), tibia II ile 1 anterolateral setanın (A) genişlemesi (C). (D) tibia III ve tibia IV ile 1 anterolateral seta. (E) genu IV ile 2 anterodorsal seta ve tibia IV ile 2 posterodorsal. Abbr. ad, anterodorsal; al, anterolateral; Cx, coxa; Fe, femur; Ge, genu; LI-IV, leg I-IV; Pa, pedipalp; pd, posterodorsal; Ta, tarsus; Ti, tibia; Tr, trochanter. Scale bar: 50 µm A, B, C, E; 100 µm D. (13)

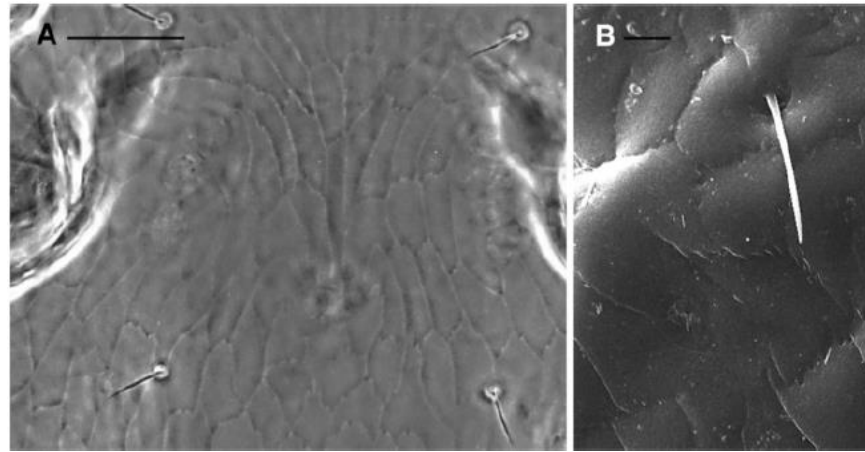
Moss (8, 14) *D. gallinae* cinsinin ayrımında dorsumun (varlığı veya yokluğu, dorsal kılıfın açık veya kapalı olması) “j” serisinin en kullanışlı kriter olduğunu belirtmiştir. Ayrıca bacak setası da türlerin belirlenmesinde kullanılabilir. (13)

Moss’un (8, 14) teşhis anahtarının kriterleri aşağıda verilmiştir:

1. belirgin omuz-sırt kılıfı (Şekil 2.5A-B)
2. kılıf kenarının tırtıklı olması (Şekil 2.10A-B)
3. dorsal kılıf üzerinde genellikle s1 ve j1 (Şekil 2.5A-B, Şekil 2.7A-C)
4. kılıf üzerinde epigynal porlar (Şekil 2.6C)
5. tibia IV pl ile 1 seta (Şekil 2.9A-C)



Şekil 2.9 Dişi *D. gallinae*. Bacak IV chaetotaxy. (A), (B), LM, IV. ayağın genel yapısı (A) ve 1 posterolateral seta ile tibianın detayları (B). (C) SEM görüntüsü: genu ve tibia IV üzerinde setanın yeri. Abbr: ad, anterodorsal; Cx, coxa; Fe, femur; Ge, genu; LIII-IV, bacak III-IV; pd, posterodorsal; pl, posterolateral seta; Ta, tarsus; Ti, tibia; Tr, trochanter. Ölçek çizgisi. 50 μ m A, B; 40 μ m C (13)

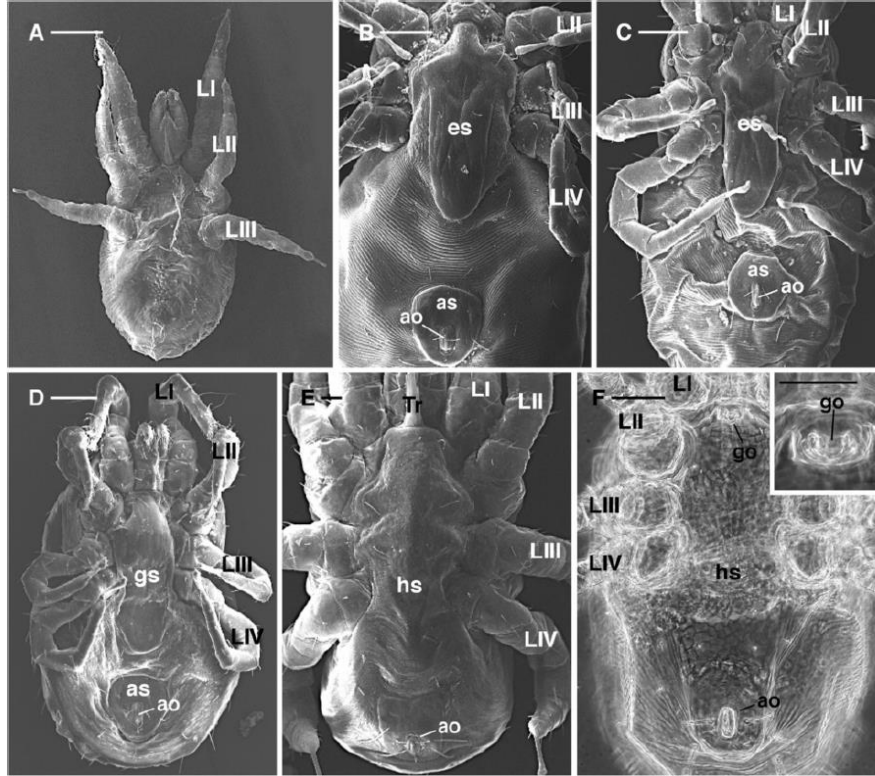


Şekil 2.10 Dişi *D. gallinae*: belirgin tırtıklı kenarları ile dorsal kılıf (A) LM, (B) SEM görüntü. Ölçek çizgisi: 50 μ m A; 10 μ m B (13)

Sonuç olarak *D. gallinae*'de bu teşhis anahtarının kullanılabilmesi için akarın dişi olduğundan emin olunması gerekmektedir. Dişilerin diğer formları (larva, proto-deotonimf, ergin) aşağıdaki gibi ayırt edilebilmektedir.

- Larva genetal delik bulunmayan ve sertleşme çok az veya hiç olmayan hexapod formdadır (Şekil 2.11A).
- Nimflerin yetişkinler gibi bacakları vardır ve kılıf farklılaşması yetişkin aşamasına geçene kadar tüy dökme ile olur (Şekil 2.11B ve C). Böylece nimflerde (Şekil 2.11B-C) epigynal kılıf yetişkin dişiye (Şekil 2.11D) kıyasla azdır ve genital delik bulunmaz.

- Küçük erkeklerde (Şekil 2.11F) presternal genital açıklık ve intercoxal bölge sternogenital sclerite ile kaplıdır. Sternogenital ve ventroanal elemanlar holovenital kılıf ile sonlanır (Şekil 2.11E-F). Tersine dişilerde epigynal kılıf vardır (Şekil 2.11D). Erkeklerin şeliserleri sperm transferi için gonopodlar gibi farklılaşmıştır ve transfer spermatodaktil ile sağlanmaktadır (13).



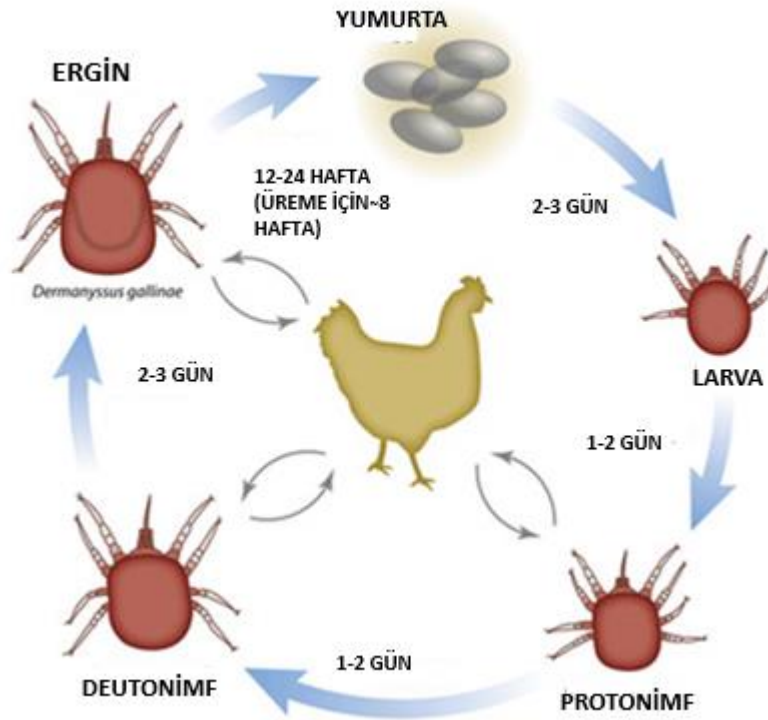
Şekil 2.11 *D. gallinae*: farklı aşamalardan genel görünüm. (A) SEM, larva ventral görünüm; (B), (C) SEM: proto and deutonymph ventral görüntüsü: epigynal kılıf dişi ile kıyaslandığı zaman erkekte indirgenmiştir; (D) SEM dişi ventral görüntüsü: gelişmiş genitoventral (epigynal) kılıf; (E) SEM, (F) LM, presternal pozisyonda holovenital kılıf ve küçük genital açıklığı gösteren erkek ventral görünüm(F). Abbr.: ao, anal açıklık; as, anal kılıf; es, epigynal kılıf; gs, genitoventral kılıf; go, genital açıklık; hs, holovenital kılıf; LI-IV, bacak I-IV; Tr, tritosternum. Ölçek çizgisi: 100 µm A-D, F; 20 µm E (13)

2.3 *DERMANYSSUS GALLINAE*'NİN BİYOLOJİSİ

D. gallinae tavuk, hindi ve güvercin gibi kanatlı hayvanlardan geceleri kan emerek beslenir. Gündüzleri duvarların yarık ve çatlaklarında saklanır. Konaklarının üzerinde 0,5-1,5 saat kaldıkları bildirilmiştir (7). Kümes hayvanlarının, kanları ile beslenen bu hematofajik parazitler, asıl konaklarını bulamadığı zaman geçici olarak memeli hayvanlara da hücum etmekte, bazen insanlarda da görülmektedir (7).

Dermanyssus gallinae'nin gelişmesinde; yumurta, larva, iki nimf (protonimf ve deutonimf) ve erişkin aşamaları görülmektedir (Şekil 2.12). Erişkin dişiler, ilk kan

beslenmesinden 12-24 saat sonra konaklarının barındıkları yerlerde duvarların yarık ve çatlakları arasına 4-8 yumurta bırakırlar. Her bir dişi yaşamı boyunca 30 yumurta bırakabilmektedir. Yumurtalar, küçük (400-270 µm) oval, düz, ince ve beyaz görünümündedir (5). Yumurta içinden çıkan 3 çift bacaklı larva, beyaz renkte olup kan emmez ve yavaş hareket eder. Yaklaşık 24-48 saat içinde gömlek değiştirir ve 4 çift bacaklı protonimf safhasına geçer. Protonimf, konağından kan emdikten sonra gömlek değiştirmek üzere konağını terk eder ve yarık ve çatlaklara gizlenir. Gizlendiği yerde gömlek değiştirip deutonimf olur. Deutonimf, konağından gece kan emer ve yaklaşık 24-48 saat içinde tekrar gömlek değiştirerek tritonimf safhasına geçer. Tritonimf safhası kimi kaynaklarda ergin gelişme dönemi olarak da tarif edilmektedir (6). Tritonimf safhasındaki akarlar, erişkinler gibi yalnız geceleri kan emerek beslenirler. Bu tritonimflerden bir iki gün içinde ergin akarlar gelişirler (5). Bu biyolojik çember, yaklaşık bir haftada tamamlanır. Bu akarların ömürleri ortalama 5 aydır (9). Parazitlerin yaşamları için %60-70 nem ile 20-25°C sıcaklığın en uygun koşullar olduğu, -20°C ve altındaki derecelerde ve 45°C üstünde akarların yaşamlarını sürdüremedikleri bilinmektedir. Bununla birlikte düşük sıcaklıklarda (5°C civarında) 5-9 ay canlı kalarak kışı geçirebildikleri ve beslenmeden yaşamlarını devam ettirdikleri bilinmektedir. Ayrıca bu akarlar, düşük neme karşı da oldukça hassasiyetleri dolayısıyla kış aylarına göre yaz aylarında daha fazla çoğalırlar. Izgaralı tabandan daha çok özellikle kümes altlığında yoğun halde bulunurlar (6).



Şekil 2.12D. *gallinae*'nin biyolojik döngüsü(13)

2.4 *DERMANYSSUS GALLINAE ENFASTASYONLARININ EPİDEMİYOLOJİSİ*

Dermanyssus gallinae, yumurta tavuklarından kan emen önemli bir ektoparazitir. Bu akarlar, kümeslerde özellikle beslenme tepsilerinde ve yuvalarda gizlenmektedir (4). Kırmızı tavuk akarları, geceleri yaklaşık 0,5–1,5 saat kan emerler ve sadece kan emmek için konak üzerinde bulunurlar. Gece ile gündüz farkının olmadığı karanlık yapılar da şiddetli enfestasyon durumunda ise bu akarlar gün boyu da konak üzerinde bulunabilirler.(4).

Serçe gibi yabani kuşlar, bu akarın başka konaklara naklinde rezervuar görevindedir (15). Bu akarın tavuklarda huzursuzluğa, yumurta veriminde azalmaya, deride tahrişe ve hatta ölümlere bile neden olduğu bildirilmiştir (16). Eritrosit sayısında ve paketlenmiş hücre hacminde de azalmaya neden olmaktadır (17).

Ayrıca bu akarlar, insanlara da saldırabilirler. İnsanlarda allerji ve ürtiker gibi cilt rahatsızlıklarına neden olabilirler (18, 19). Bir şekilde ezilerek parçalanmış akarlardan etrafa saçılan kan lekeleri, tavukların yumurtalarına bulaşarak yumurtaların

lekelenmesine yol açarlar. Böylece yumurta kabuğundaki kan lekeleri, yumurtada kalite kaybı oluşturur. Dolayısıyla işletmede büyük ekonomik kayıplar meydana gelir (20).

Akar popülasyonları, uygun mevsim koşullarına bağlı olarak boş tavuk çiftliklerinde de üç ay içerisinde artış gösterebilir (21). Öte yandan bu akar, bazen insanların yaşadığı konutlarda bile saklanabilir. Özellikle çatılarında güvercin beslenen konutlarda ağır enfestasyonlara yol açabilirler (16, 22, 23).

2.4.1 Dünyadaki Yayılış

Kırmızı tavuk akarı *D. gallinae*, Çin, Japonya, Amerika ve ABD dahil olmak üzere dünyanın birçok yerinde yumurta tavukları için önemli bir tehdit oluşturmaktadır (4, 24-26). Birleşik Krallık'taki yumurta tesislerinin %60-85'i *D. gallinae* ile enfeste olduğu rapor edilmiştir (27, 28). Son verilere göre akarın Birleşik Krallık ve Amerika gibi bazı ülkelerde çok yaygın olduğu bildirilmiştir (20, 25). Avrupada yapılan bir araştırmada kümeslerin *D. gallinae* ile enfestasyon nedeninin genelde ticaret yolu (kanatlı hayvanlar, yumurta sandıkları vb.) olduğu tespit edilmiştir (29). Başka bir veriye göre ise örn, Brezilya'da enfestasyonun bulaşma dinamiğini, *D. gallinae* ile enfeste yabani kuş sürüleri oluşturmaktadır (7, 30).

Çok sayıda araştırmada yumurta üretim tesislerinde *D. gallinae* enfestasyonu bildirilmiştir (27, 28, 31). Konvansiyonel kafesler, enfestasyona daha az müsait olduğu için ve oluşan enfestasyon tedavisinin kolay olduğundan tercih edilmektedir (32). Bununla birlikte konvansiyonel kafesler hayvan sağlığı gerekçesiyle Avrupa Birliğinde (AB Konsey Direktifi 1999/74/AB) kullanılabilmekte ancak evrensel bir kontrol seçeneği olarak kabul edilmemektedir. Bu tür sistemler 2013 yılına kadar AB'de kullanılmıştır fakat daha sonra alternatif seçenekler de kullanılmaya başlanmıştır. Sonuç olarak bulundukları çevre şartları daha kompleks hale geldiğinde dişi *D. gallinae*'nin bölgede ki yayılma oranı artabilir (25).

2.4.2 Türkiye'deki Yayılışı

Türkiye'de günümüze kadar *D. gallinae* üzerine yapılmış kapsamlı çalışmalar çok sınırlıdır. Tiğin (33) incelemesini yaptığı 300 evcil güvercinin 36'sında (%8,61) *D. gallinae* enfestasyonu belirlemiştir. Gıcık (34), 200 yabani güvercini incelediği çalışmada *D. gallinae* enfestasyonunu bir örnekte (%0,5) saptadığını kaydetmiştir. Bununla birlikte,

Kars ilinde tavuklarda bulunan ektoparazitlerin yaygınlığının araştırılması amacıyla yapılan çalışmada (35) Kars'ın kenar semtlerindeki evlerde bulunan 20 kümeden 264 tavuk ektoparazit yönünden incelenmiştir. Çalışmada yirmi kümesin 12'sinde (%60,0), bakısı yapılan 264 tavuğun 174'ünde (%65,90) en az bir ektoparazit saptanmıştır (35). Enfeste tavuklardan 1023 adet parazit toplanmış ve 7 tür identifiye edilmiştir. Yaygınlık sırasına göre; 174 tavuğun 156'sında (%89,65) bit enfestasyonu (*Menacanthus cornutus*, *Menopon gallinae*, *Menacanthus stramineus*, *Goniodes dissimilis* ve *Goniocotes gallinae*), 16'sında (%6,06) akar enfestasyonu (*Dermanyssus gallinae*) ve 2'sinde (%0,75) uyuz enfestasyonu (*Kinemidokoptes mutans*) saptanmıştır (35). Bursa'da köy tavuklarında yapılan bir çalışmada (36); 628 tavuğun %4,0'ünde *D. gallinae* enfestasyonu saptandığı bildirilmiştir. 2004 yılında Konya'da yapılan bir çalışmada (37) doğal olarak oluşan *D. gallinae* enfestasyonunun horozların bazı hematolojik parametrelerinde ve canlı ağırlıklarında bir değişiklik oluşturup oluşturmayacağı araştırılmış ve *D. gallinae*'nin horozlarda alyuvar sayısı, hemoglobin miktarı ve hematokrit değerinde azalmaya yol açması nedeniyle belirgin bir anemiye yol açtığı, akyuvar tiplerinden heterofil oranında artışa, lenfosit oranında ise azalmaya neden olarak immun sistemi etkilediği, heterofil/lenfosit oranında artışa yol açarak kanatlıları yoğun bir stres altına soktuğu ve canlı ağırlık kaybına yol açtığı ortaya konmuştur. Bir diğer çalışmada (3) ise doğada tesadüfen bulunarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıklar Anabilim dalında getirilen bir kırlangıç yavrusunda *D. gallinae* ile enfestasyon teşhisi konulmuş olup bu çalışma sonucunda yabani kanatlıların *D. gallinae* enfestasyonları için evcil kanatlılara risk oluşturduğu belirtilmiştir. Türkiye'de *D. gallinae*'nin moleküler genotiplendirilmesi ve vektörlük potansiyeli üzerine yapılmış moleküler tabanlı araştırmalar henüz bulunmamaktadır.

2.5 *DERMANYSSUS GALLINAE* ENFESTASYONLARINDA KLİNİK VE PATOGENEZ

Bu parazit, özellikle genç hayvanlara zarar vermektedir (6). *D. gallinae*, konaklarının derilerinde kızarıklık, şişkinlik ve irritasyona yol açar, genellikle alopecia ve nekrotik odaklarla karakterize dermatitis görülür, şiddetli pruritis vardır (38). Akarların ısırma yeri ağrılı ve kaşıntılı olup, enfestasyon semptomları olarak huysuzluk ve tedirginlik, deri reaksiyonları, deride irritasyonlar, ikincil yaralar, tüy ve telek dökülmesi, çok kuvvetli enfestasyonlarda anemi, zayıflama, yemden yararlanmanın azalması, iştahsızlık ve

kaşeksi daha az olarak da rhinitis, otitis externa, konjiktivitis ortaya çıkabilmektedir (6). Ayrıca eritrosit sayısında ve paketlenmiş hücre hacminde azalma belirlenmiştir (17). Diğer yandan, *D. gallinae* enfestasyonu nedeniyle, kuluçka sonu ölü civcivlerin sayısında artış olduğu, yetişkinlerde ve genç kanatlılarda yumurta veriminin azaldığı, canlı ağırlık kaybının olduğu ve bazen de enfeksiyonun ölümle sonuçlanabildiği bildirilmektedir (9). *D. gallinae*, kanatlı sektöründe doğrudan ölümlere sebep olmasının yanında ayrıca bakteri ve virüsler başta olmak üzere çeşitli patojenlerin kanatlılara mekanik ve/veya biyolojik naklinde de önemli ve potansiyel bir vektör olduğu güncel çalışmalarla ortaya konmuştur (1, 2).

D. gallinae kanlı hariç insan ve diğer bazı memelilerden de kan emebilmekte olup tavukçulukla uğraşan insanlarda daha sık olarak görülmektedir. *D. gallinae* ile temas eden insanlarda 1-3 gün sonra temas yerlerinde şiddetli kaşıntı, toplu iğne büyüklüğünde papül ve veziküller oluşmaktadır. Bu papüller kanlı bir kabukla kaplanır ve iyileşmenin sonunda buralarda mavi bir lekenin olduğu gözlemlenmiştir (39).

2.6 *DERMANYSSUS GALLINAE*'NİN TANISI

Akarların tanısı genelde makroskobik olarak yapılmakta olup mesken ve konak üzerinde akarların görülmesiyle konmaktadır (Şekil 2.13). Bir büyüteç yardımı ile makroskobik olarak konak üzerindeki ve saklandıkları yerlerdeki akarlar rahatlıkla görülebilmektedir. Tavukların kırmızı akarı, gece kan emmesi sırasında bir ışık yardımıyla konaklar üzerinde görülebilmektedir. Eğer kafes kuşlarında enfestasyondan şüpheleniliyorsa kafes gece beyaz bir örtüyle örtülebilir. Sabah örtü üzerindeki küçük siyah kırmızı akarlar görülür. Nekropside şiddetli enfestasyonlarda hayvan üzerinde çok sayıda akara rastlandığı, seyrek olarak da gagada, özefagusta, tracheada ve kursakta da görülebildikleri kaydedilmiştir (40). *D. gallinae*'nin gelişim dönemlerine göre identifikasyonu için morfolojik kriterler bölüm 2.2'de verilmiştir.

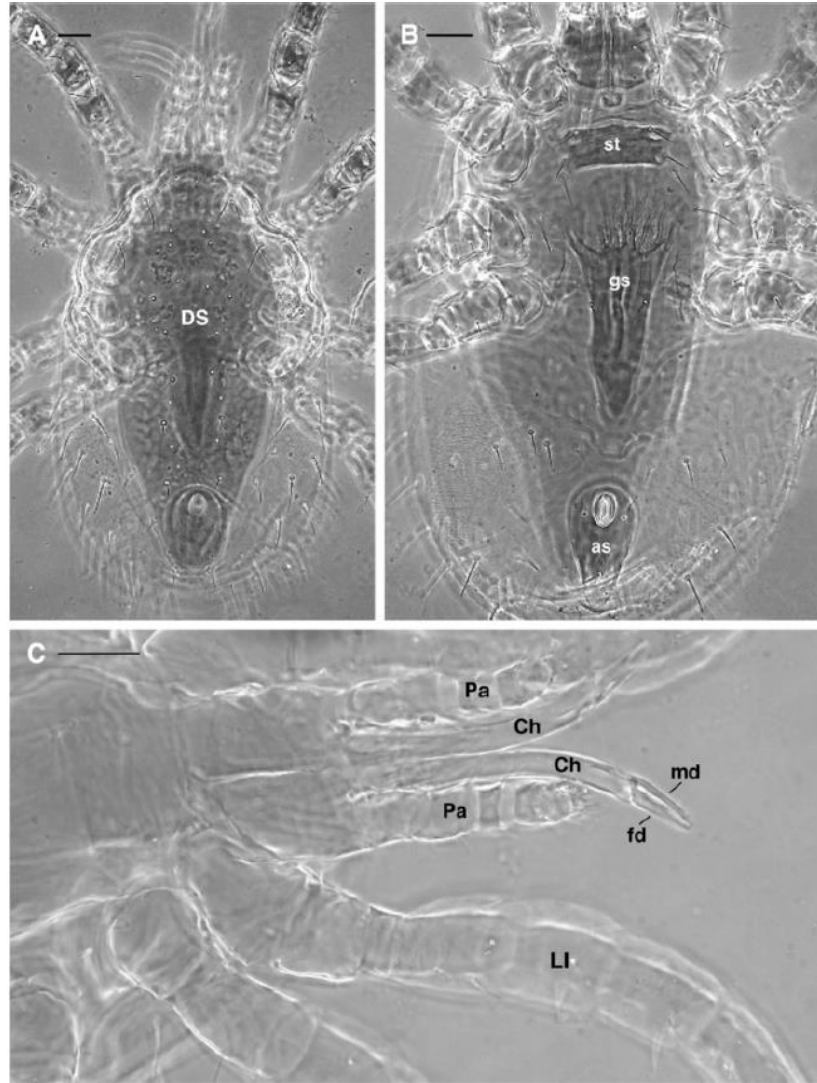


Şekil 2.13Tavuktan kan emen *D. gallinae* (Kaynak: <http://www.vetsonline.com/publications/veterinary-times/archives/n-43-27/managing-and-treating-common-diseases-of-backyard-poultry.html>)

2.6.1 Ayırıcı Tanı

Ornithonyssus sylviarum da dermanyssoid bir akardır fakat Dermanyssidae ailesi yerine Macronyssidae ailesinde bulunur (41). *O. sylviarum*ve *D. gallinae* ayrımı zor olmakla birlikte aşağıdaki özellikler ayırmada yardımcı olabilir (13):

1. Dişilerin şelisierleri uzamıştır ve hareketlidir (Şekil 2.14C) (*D. gallinae*'de kırbaç gibi belirgin olmayan kısaç vardır) (Şekil 2.14C, 2A)
2. Genitoventral (epigynal) kılıf incedir ve posterior dar ve yuvarlaktır (*D. gallinae*'de posterior geniş ve yuvarlak) (Şekil 2.14B)(Şekil 2.6C-D).
3. *O. sylviarum* dorsal kılıfı aniden posteriore doğru daralır (*D. gallinae*'de daha düzgün daralır) (Şekil 2.14A).



Şekil 2.14 Dişi *Ornithonyssus silviarum*: LM. (A) dorsal kılıfın posteriore doğru daralması, dorsal görünüm. (B) genitoventral (epigynal) kılıf incedir ve posteriore dar ve yuvarlaktır, ventral görünüm. (C) iyi gelişmiş, hareketli ve uzun şeliserin görünümü. Abbr: as, anal kılıf; Ch, şeliser, DS, dorsal kılıf, fd, sabit digit ;gs, genitoventral kılıf; LI, leg I; md, hareketli digit; Pa, pedipalp; st, sternal kılıf. Ölçek çizgisi: 50 µm (13)

2.7 KORUNMA VE KONTROL

2.7.1 Kimyasal Kontrol Metodları

D. gallinae'nin kontrolünde 35'in üzerinde bileşiğin (klorlu organik bileşikler, organofosfatlar, piretroidler, karbamatlar, amitraz ve endektositler) kullanıldığı bildirilmiştir (4). Bunların birçoğu etkili olsa da bazıları gıda güvenliği ve çevresel nedenlerden dolayı uygun görülmemiştir. Bazıları da teorikte yeterli görülmüş ancak pratikte verimli olamamıştır.

En ideal insektisit kuytu köşelere saklanmış akarlara bile nüfuz edebilmeli ve akarların tavuklardan beslenmek için saklandıkları yerden çıkana kadar mümkün olduğunca uzun bir süre etkinliğini devam ettirebilmelidir. Uygun bir insektisit parazit için seçici olmalı ancak insektisit dirençliliğine neden olmamalıdır.

Sprey ya da toz halinde olan alışılmış böcek ilaçlarının yanında sistemik bileşikler de denenmiştir. Sistemik kontrol yöntemleri de cazip gelmiştir çünkü herhangi bir özel püskürtme ekipmanına ihtiyaç duyulmamakta ve tavukları strese sokmadan uygulanabilmektedir (4). Karbaril ve çeşitli organik fosforlu bileşiğin etkinliği sistematik akarisitlerde test edilmiştir. Çoğu böcek ilacından daha etkili olduğu için makrosiklik lakton endektositleri kırmızı akar kontrolü için potansiyel moleküller olarak kabul edilmiştir. Ivermektin (42, 43) ve moksidektin (44) kas içinden ya da periton içi enjeksiyon ile test edilmiştir. Ivermektin yüksek dozda uygulandığında (1,8-5,4 mg kg-1) kısa süreliğine etkili olmuştur. Meksidektin de benzer şekilde (8mg kg-1) etkili olmuştur. Bunlar etkili dozda uygulandığında kısa sürede tekrarlayan tedavilerden dolayı malzeme ve işçiliğin pahalı olmasıyla yaygın olarak kullanılmamaktadır (4).

İlaç uygulamasına geçmeden önce korunma ve kontrol bölümünde bildirilen mekanik, biyolojik yöntemleri uygulamak gerekir. Bu yöntemler uygulanmadığı takdirde, bugün olduğu gibi ülkemizde ve bütün dünyada bu akarlar problem olmaya devam edecektir. Kimyasallar seçilirken dikkat edilmesi gerekenler:

- a. Kimyasallar bulaşmaya bağlı olmak üzere kuş, kuş yuvası, kemirici veya kümeste kullanılmak üzere belirlenmelidir.
- b. Kimyasallar toksisitesi ile çevreye en az etkili olan seçilmelidir.
- c. Kimyasalın üretim gereksinimleri ile uyumlu olmalıdır.
- d. Kimyasallar kümeslerdeki gerek yüzey ve gerekse ekipmanların malzemelerine (ahşap çitallı platformlar, galvanizli metal kutular, karton, mukavva kutular vb.) göre seçilmelidir.

D. gallinae ile mücadelede, çevredeki tavuk, hindi ve güvercinlerle birlikte, kümeslerin de ilaçlanması gerekir. Bunun için karbamatlı (Bolfo, Baygon, Opigal-5) insektisidler serpmeye, organik fosforlu insektisidler (Neguvon, Asultol) püskürtme, serpmeye veya tütsü,

sentetik pretroidli insektisidler (Cypermethrin, Permethrin, Cyflutrin) ise püskürtme şeklinde kullanılması önerilmektedir. Avermectinlerin de korunma ve tedavide denenmesi önerilmektedir (3, 45-47).

Karbamatlı insektisitlerden Carbaryl (Baygon) ve Propoxur (Bolfo) atomizerle bütün kümese 2 hafta arayla %5'lik toz halinde püskürtülmesi önerilmektedir (9). Organik fosforlu akarisitlerden Trichlorphon (Neguvon) ve Caumaphos'dan (Asulton) kullanılarak bu parazite karşı olumlu sonuçlar alınmıştır. Bütün kümes, yem deposu, kuluçkahane ve yumurta violllerinin konulduğu yerler dahil, her yer Trichlorphon'un %0,2'lik solüsyonu ile ilaçlanması önerilmektedir. İlaçlama yumurtadan çıkan larvalara karşı 2-3 gün arayla birkaç kez tekrar edilmelidir. Gerekirse tavukların bu solüsyonda banyo ettirilmesi önerilmektedir (9, 45).

Sentetik pretroidli insektisidler Cypermethrin (İmperator), Permethrin (Primetrin), Cyfluthrin (Solfac, Bayofly) ise püskürtme şeklinde kullanılması tavsiye edilmektedir (9). Kanatlı hayvanların barındıkları kafesler ve yerler %2-7 carbamate solüsyonlarının sprey şeklinde uygulanması önerilmektedir (48). Kümesin zemin yüzeyinin metre küpüne 0,5 gr Carbaryl'in %85'lik ıslanabilir tozundan hazırlanan aerosol toz püskürtülmesi, karbamate %7,5 toz 4 gr/metre küp dozda uygulandığında, bir ay içerisinde *D. gallinae*'lerin öldükleri ve ilacın tavuklarda herhangi bir yan etkiye rastlanmadığı ifade edilmiştir (49).

2.7.2 Akarisit Direnci

Tekrarlayan *D. gallinae* popülasyonlarının uzun vadeli kimyasal kontrolü akaların kalıtsal direncinin gelişmesine neden olabilmektedir. Son zamanlarda Fransa'da (50), İtalya'da (51) ve Eski Çekoslovakya'da (52, 53) DDT, organofosfatlar veya piretroid direncinin oluşabileceği düşünülmüştür. Ancak tedavi başarısızlıklarının nedeni, kazanılmış akar direnci veya yetersiz akarisit tedavisi de olabilmektedir. Bazı kimyasalların dirençliliğini taramanın ve saha etkinliğini test etmenin zor olması nedeniyle invitro testler gereklidir. İki tür in vitro test kullanılmaktadır: Cam Pasteur pipeti testleri (52, 54) ve Whatman filtre kâğıdı testleri (50).

Yeni akarisitlerin yetersizliği nedeniyle direnç yönetim stratejisinde farklı kimyasal grupların uygulanmasının kısa sürede direnç değişimine neden olduğu tespit edilmiştir.

Akarisitlerin farklı grupları dönüşümlü olarak kullanılmalıdır ve diğer alternatif tedaviler incelenmelidir (4).

2.7.3 Aşı Denemeleri

Eklem bacaklılara karşı aşılarda geliştirilmesi oldukça zor olmasına karşın birçok özellikleriyle aşılarda yine de akarisitlere cazip bir alternatif oluşturmaktadır. Bu zorluk yeni koruyucu antijenlerin karakterizasyonu ve identifikasyonunun uzun sürmesine ve antijene karşı konak immün reaksiyonlarının artropodlara etki düzeyinin soru işaretleri taşımasına bağlıdır (55, 56). *D. gallinae*'ye karşı aşı geliştirilmesi akar-konak ilişkisinin nispeten az bilinmesi nedeniyle gerçekleştirilebili olması zor gözükmektedir (57).

Tavuklar, *O. sylviarum*'a (58, 59) karşı direnç geliştirebilmesine karşın *D. gallinae*'ye karşı direnç oluşturamıyor gözükmektedir (21). Bu sebeplerle *D. gallinae*'ye karşı potansiyel bir aşı geliştirilmesi üzerine günümüze kadar az sayıda çalışma yapılmıştır. Somatik *D. gallinae* antijenleri ve homolog diğer bazı akar türlerinin (örneğin *Dermatophagoides pteronyssinus*) proteinleri kanatlı immunizasyonunda denenmiş fakat kısmi bir başarı sağlanmıştır (60). İn vitro olarak immunize kanatlılardan yumurta-ekstrakte antikorları içeren kan ile akarların beslenmesiyle akarlarda önemli oranda (%7,5-50,6 arasında) mortalite gözlemlenmiştir (57, 61). Ancak akarların in vitro olarak *D. gallinae* proteinleri ile bağışıklık kazanmış kanatlıların kanı ile beslenmeleri durumunda mortalite oranının önemsiz olduğu belirlenmiştir (62). İn vitro akar çalışmalarının gelecekteki araştırmaları kolaylaştırmasına rağmen yinede eksiklikleri vardır (62-64). Şimdiye kadar in vitro akar beslenme/akar eliminasyon deneme sonuçları beklenen etkiyi göstermemiş olsa da bu konudaki gelişmeler ileri çalışmalar için imkan sağlamıştır (62-64).

Somatik akar proteinlerin kullanımına alternatif bir yaklaşım da tavukların sivrisinek (subolesin) ve kenelerden (Bm86) derive olan rekombinant proteinlerle immunizasyonudur. *D. gallinae*'de in vitro ölüm oranlarının subolesin ve Bm86 uygulamalarında sırasıyla %35 ve %23'e kadar ulaştığı rapor edilmiştir (65). Ayrıca genomik düzeyde Dg-HRF-1 (*D. gallinae* histamin salınımı faktör proteini) (*D. gallinae*'de tespit edilmiş kene HRF ortologu) (66) ve hem Dg-HRF-1 hem de Dg-CatD-1 (rekombinant katepsin D- ve L- benzeri proteinaz) müşterek kullanımının *D. gallinae*'ye karşı aşı aday potansiyelleri araştırılmıştır (67). Dg-HRF-1 ile in vitro testler

tavuk bağışıklığında kullanıldığı zaman *D. gallinae* mortalitesinde %7 lik bir artış gözlenmiştir (66). Benzer olarak akarların beslenmesinden sonraki ilk 120 saatteki verilere göre akar ölümü Dg-CatD-1 ile tedavi edilen grupta Dg-CatL-1 ile tedavi edilen ve kontrol grubundan daha yüksek olduğu saptanmıştır (67). Bu son antijen araştırmaları *D. gallinae*'ye karşı somatik ve rekombinant protein tabanlı aşı geliştirilmesinde bir potansiyel olduğunu ortaya koymuş olmakla birlikte ticari bir aşı üretimine geçmeden önce aşılması gereken bir çok önemli hususun olduğu da rapor edilmektedir (68).

2.7.4 Fiziksel Kontrol Yöntemleri

Kümesler yetiştirme dönemleri arasında birkaç ay boş bırakılmalıdır. Kümes iç ve dış duvar yüzeyinde akarların saklandıkları çatlak ve yarıklar sıva ile kapatılmalıdır. Kümeslerde malzemeler boşaltılıp, temizlik mekanik olarak yapılmalıdır. Kümes ve kümes içindeki tüm ekipmanlar her yetiştirme dönemi sonunda ve başında basınçlı buharlarla yıkanmalıdır. Kümeslere etkenleri taşıyan kuş, sinek ve kemiricilerin girmesiyle kuşların kümeslere yuva yapmaları engellenmelidir. Özellikle serçeler yuvalarını tavuk tüyleri ile yaptıklarından bu parazitin kümesler arası naklinde önemli rol oynamaktadırlar. Akarlar nemliliğe çok duyarlı olduğu için su ile düzenli aralıklarla duvarlar yıkanmalıdır. Ayrıca vakumlu ev temizleyici elektrikli süpürgeler akarın yaşaması için gerekli olan tozların ortadan kaldırılmasında gerekli ve etkili olmaktadır. Akarların kontrolünde kümeslerin mekanik temizliğinin, herhangi bir dezenfektan (mertonat) kadar önemli olduğu bildirilmektedir (6).

2.7.5 Biyolojik ve Alternatif Mücadele Yöntemleri

Biyolojik mücadele preditörlerle (Örn: bazı karınca ve örümcek türleri ile *Bacillus thuriungensis*, *Alphatabius diaperinus*, *Androlaelaps casalis*, *Hypoaspis aculeifer*, *Stenus vulgaris* gibi) yapılanıdır. Bunlardan en yaygın kullanılanı ve en uygunu *Bacillus thuriungensis*'in kristalize toksinleridir. Alternatif biyolojik yöntemlerden bir diğeri sınırlı yerlerde kullanılmalarına rağmen silica tozlarıdır. Bu toz akarlarda vücut yüzeyindeki emilimi bozmak suretiyle dehidrasyona ve dolayısıyla ölümüne neden olmaktadır. Ayrıca böcek büyüme düzenleyicileri (Insect growth regulators =IGR) *D. gallinae* popülasyonunu azaltmaktadır. Buna karşılık diflubenzuron, triflumuron gibi kitinazasyon engelleyicileri (=chitinsynthesis inhibitors) akar sayısını azaltmada başarılı olmamaktadır (4).

Ayrıca kümeste uygun havalandırma ile akarsız sertifikalı piliçlerin kullanılması kontrol önlemi olarak tavsiye edilmektedir (69). Piliç taşıma araçlarının ve taşımada kullanılan malzemelerin buhar, ateş, su veya dezenfektanlarla temizlenmiş olması gerekmektedir (4).

2.8 *DERMANYSSUS GALLINAE*'NİN VEKTÖRLÜK POTANSİYELİ

D. gallinae hayvanlarda ve insanlarda ciddi hastalıklara yol açan patojenik ajanların naklinde önemli olduğu bilinmektedir (70, 71). Ancak günümüzde patojenlerin bulaşma dinamikleri yeteri kadar önemsenmediği için Dermanyssoidea vektörlük rolü ile ilgili çalışmaların da sınırlı kaldığı görülmektedir. Bunun yanında kümes hayvanlarının kırmızı akarının göz ardı edilemeyecek kadar önemli bir sorun oluşturduğu belirtilmektedir (68, 72). Günümüze kadar *D. gallinae*'nin vektörlük potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar sonucu akarlar ile ilgili patojenlerin listesi Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2 *D. gallinae* ile ilgili viral ve bakteriyel patojenler (2, 68)

	Patojen	Ayrıntılar
Bakteri	<i>Salmonella gallinarum</i>	Akarlardan izole edilmiştir
	<i>Salmonella enteritidis</i>	Bulaşma gösterilmiştir
	<i>Pasteurella multocida</i>	Bulaşma gösterilmiştir
	<i>Chlamydia</i> spp.	Akarlardan izole edilmiştir
	<i>Borrelia anserina</i>	Bilinmiyor
	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Akarlardan izole edilmiştir
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Akarlardan izole edilmiştir
	<i>Coxiella burnetii</i>	Bulaşma gösterilmiştir
	<i>Escherichia coli</i>	Akarlardan izole edilmiştir
	<i>Staphylococcus</i> spp.	Akarlardan izole edilmiştir
	<i>Streptomyces</i> spp.	Akarlardan izole edilmiştir
	Spirochetes	Bulaşma gösterilmiştir

Virüs	Kanatlı leucosisi	Bilinmiyor
	Avian influenza A	Bulaşma gösterilmiştir
	Yalancı veba	Akarlardan izole edilmiştir
	Tavuk çiçeği virüsü	Bulaşma gösterilmiştir
	St. Louis ensefalit	Bulaşma gösterilememiştir
	Keneye taşınan ensefalit	Bulaşma gösterilememiştir
	Doğu at ensefaliti	Bulaşma gösterilmiştir
	Batı at ensefaliti	Bulaşma gösterilmiştir
	Venezüella at ensefaliti	Bulaşma gösterilmiştir

2.8.1 *Salmonella* Enfeksiyonları

Kanatlı çiftliklerindeki en büyük sanitasyon problemlerinden birisi de *Salmonella* enfeksiyonlarıdır. *Salmonella* dünyada ki en yaygın zoonoz hastalıklardan birisidir ve kanatlılarda herhangi bir klinik tablo oluşturmada bulunabilir. *Salmonella enterica* türünün *enterica* alt türü *Enteritidis* serotipi (*Salmonella enteritidis*) insanlardaki salmonella enfeksiyonuna neden olan en önemli serotiptir ve birçok hijyen kontrolleri ile çoğalmasını engellemek amaçlanmaktadır (73, 74). Ancak bu enterobakterilerin çevreye karşı çok dirençli olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin bu koliform bakteriler kanatlı dışkısında 2,5 yıl hayatta kalabilmektedir (75).

Salmonella bakterisinin 4 ay boyunca *D. gallinae* içerisinde hayatta kalabildiği belirlenmiştir. Ayrıca hamam böceği, karasinek ve çöp böceği gibi arthropodların da *Salmonella* enfeksiyonlarının nakli açısından önem arz ettiği bildirilmektedir (76-78). Zeman ve ark. (79), akarların enfekte kanatlılardan kan emerek veya kuş dışkısından ya da kontamine yüzeylerden *Salmonella* enfeksiyonunu alabileceğini gözlemlemiştir.

Valiente More ve ark. (71), *D.gallinae*'nin *S. enteritidis*'in biyolojik vektörü olduğunu invito olarak ispatlamışlardır. Yapılan çalışmada (71) deneysel enfeksiyon sonrası

akarların %29'unun kanatlılardan kan emerek, %53'ünün kutikular temas sonrası *Salmonella* ile enfekte olduğu bildirilmiştir.

Araştırmacılar (71) tavuk çiftliklerinde akarların *Salmonella* ile enfekte olmasının iki yolla olabileceğini göstermişlerdir. Bunlardan ilkinin *Salmonella* bulunan yüzey ile kutiküler temas ikincisinin ise enfekte kanatlılardan kan emme yoluyla olduğunu kaydetmişlerdir. Paraformaldehyde'in tüm dış kontaminasyonlardaki etkinliği göz önüne alındığında kutikular enfeksiyon için iki hipotez öne sürülmüştür: bakterinin transkutikular geçişi veya mikroorganizmanın stigmadan girişi(79). Ayrıca akarlarda *Salmonella* çoğalımı gösterilmiş olup bazı durumlarda bakteri sayısında da düşüş gözlemlendiği rapor edilmiştir (71). Bu molaritedeki düşüşün nedeni bazı bakterilerin akarların sindirim sistemi tarafından imha edilmesi şeklindeki bir antibakteriyel yanıt olabileceği bildirilmiştir (80, 81). Ayrıca Valiente More ve ark. (71) akarların kan emme esnasında enfekte kanı almasından sonra *Salmonella*'nın transovarial yolla bulaşabileceğini belirlemişler, protonymphden deudonymphe transstadial nakil olduğu ancak deudonymph ile yetişkin arasında bir nakil olamadığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak *D. gallinae*'nin temas yoluyla veya önceki kan beslenmesi esnasında almış olduğu *Salmonella* bakterisini diğer bir kanatlı kanına bulaştırma potansiyeli ortaya konmuştur (71). Bu durum az sayıda *Salmonella* vakaları görülse dahi enfesete kanatlı işletmelerinde *Dermanyssus* popülasyonlarının yoğunluğu dikkate alındığında önem arz etmektedir(82). Aynı zamanda *Salmonella* uzun süre konakçısı dışında yaşayabildiği için (sığır ya da kuş dışkısında yaklaşık 2.5 yıl) akar popülasyonlarının enfekte olma riskini artırmaktadır. Araştırmacılar (71) yine bakteri ile enfekte akarların kanatlılara etkeni kan beslenmesi sırasında naklinden ziyade henüz ölmüş veya ezilmiş enfekte akarların ağız yolu ile kanatlılar tarafından alınması yolunun enfeksiyon için çok daha önemli olduğunu vurgulamışlar ve *D. gallinae*'nin doğal ortamda etkin vektörlük rolünün kanıtlanabilmesi için detaylı epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç olduğunu altını çizmişlerdir.

Güney Kosova'da 14 adet tavuk çiftliğinde *D. gallinae* prevalansı %50 olarak belirlenmiş olup pozitif saptanan çiftliklerdeki tavuklardan izole edilen *D. gallinae* örneklerinin %37,5'i PCR ile *Salmonella* spp. yönünden pozitif belirlenmiştir (83). Fransa'da Valiente Moro ve ark. (72), *D. gallinae*'de *Salmonella* spp.'nin spesifik identifikasyonu amacıyla 16S rDNA gen bölgesini hedef alan FTA® (filtre tabanlı polimeraz zincir reaksiyonu) tekniğini geliştirmişler ve etkinliğini oldukça yüksek bulmuşlardır. Araştırmacılar (72) *D.*

gallinae enfestasyonu görülen 16 farklı tavukçuluk işletmesinde yürüttükleri çalışmada söz konusu teknik ile *Salmonella* spp.'nin varlığını tespit etmişler ve çiftlikler arasında bulaşma açısından *D. gallinae*'nin rezervuar önemini ortaya koymuşlardır.

2.9 *DERMANYSSUS GALLINAE* ÜZERİNE MOLEKÜLER VE FİLOGENETİK ÇALIŞMALAR

Birçok ektoparazitin başarılı identifikasyonu uzman ve tecrübeli taksonomistler tarafından yapılabilmektedir. Günümüzde nükleer ribozomal DNA (84) veya mitokondrial DNA (85, 86) parsiyel sekansları tür identifikasyonlarını kolaylaştıran bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Özellikle rDNA'nın ITS sekansları bazı akar türlerindeki taksonomik problemlerin çözülmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (87-89). Ayrıca mt-COI ve ITS sekansları birçok akar türünün evrimsel gelişimlerinin ve ilişkilerinin araştırılmasında da yaygın olarak kullanılmış ve filogenetik yapılarının şekillenmesinde oldukça faydalı olmuşlardır (90).

Brannström ve ark. (91), İsveç'in 4 farklı coğrafik bölgesindeki yabani kuşlardan izole ettikleri *D. gallinae* örnekleri ile yumurta tavukçuluğu işletmelerinden izole ettikleri *D. gallinae* örneklerinin small subunit (SSU), 5.8S rRNA ve iki ITS rRNA gen bölgelerini analiz etmişler, her iki popülasyon için SSU, 5.8S ve ITS-2 sekanslarının identik olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar (91) buna karşın ITS-1 sekanslarında önemli farklılıklar belirlemişlerdir. ITS-1 sekanslarındaki bu farklılıklar temelinde bu akarların yabani ve evcil orijinli olmak üzere iki genotipe ayrılabilceğini öne süren araştırmacılar (91) grup içinde farklılıkların olmadığını da belirlemişlerdir. Potenza ve ark. (92), İtalya'nın Apulia ve Basilicata bölgelerindeki 7 kümes ve 6 güvercin yuvasından topladıkları *D. gallinae* örneklerinin ribozomal complete ITS-1, 5.8S ve ITS-2 bölgelerini bu akarın identifikasyonunda kullanılmalarının uygunluğunu ortaya koymak amacıyla sekans varyasyonları yönünden analiz etmişlerdir. Araştırmacılar (92) Brannström ve ark.'nın (91) bulgularına paralel olarak 5.8S ve ITS-2 gen bölgelerinde varyasyon bulunmadığını buna karşın ITS-1 gen bölgesinde zayıf intraspesifik varyasyonların bulunduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar (92) aynı zamanda ITS-2 gen bölgesinin amplifikasyonu için dizayn ettikleri primerler ile Nested PCR analizleri gerçekleştirmişler ve akabinde uyguladıkları RFLP analizi ile de bu akar için kullanılan bu tekniğin hızlı ve güvenilir bir moleküler teşhis aracı olduğunu belirtmişlerdir. Marangi ve ark. (93), Kuzey ve güney İtalya'nın 10 farklı bölgesindeki 24 farklı kümes hayvanı

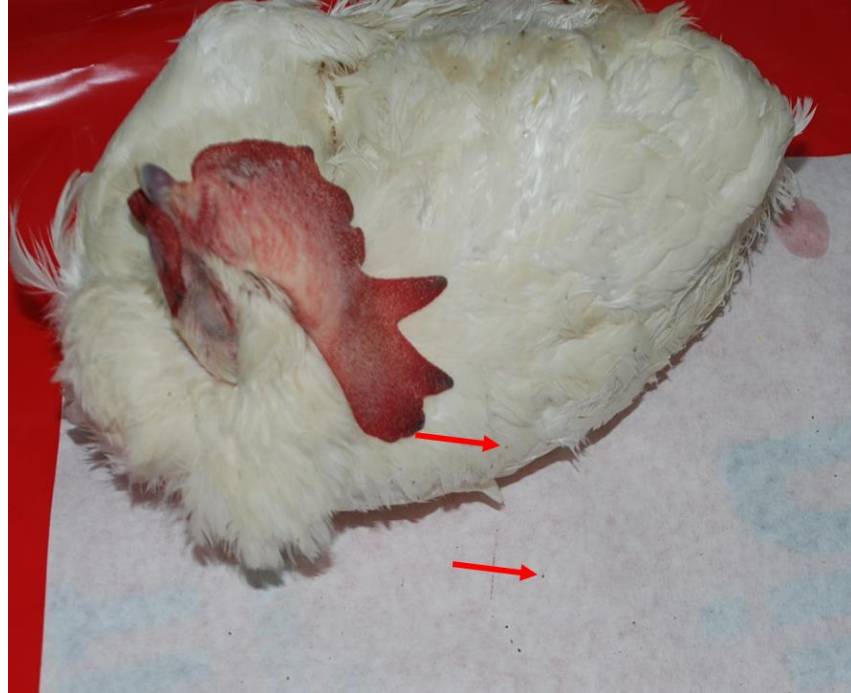
çiftliğinden topladıkları *D. gallinae* örneklerinden 360'ının mt-COI ve ITS+ (ITS1+5.8S+ITS2) gen bölgelerinin sekans analizlerini gerçekleştirmişler, çeşitli Avrupa ülkelerinden GenBank'a kayıtlı izolatlarla birlikte değerlendirerek mt-COI gen bölgesinin filogenetik analizleri sonucu sekansların iki grupta (A ve B) kümelandiklerini belirlemişlerdir. Buna karşın çalışmada (93) ITS+ gen bölgesinin filogenetik analizi sonucu geniş olarak çözümlenmemiş clusterlar ile sonuçlandığı kaydedilmiştir. Araştırmacılar (93) akar popülasyonlarının ülke içi ve farklı ülkelerdeki izolatlar bütününde karşılaştırmalı analiziyle elde edilen genetik destek bilginin *D. gallinae*'nin popülasyon dinamiklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacağını rapor etmişler ve bunun da ayrıca ortaya çıkabilecek akarisit dirençliliği ve enfestasyondan korunma ve tedavi için alternatif stratejilerin geliştirilmesinde genetik markerların identifikasyonuna olanak sağlayacağını kaydetmişlerdir.

Chu ve arkadaşları (94)*D. gallinae*'nin genetik çeşitliliğini Asya ülkelerinde ilk kez incelenmiştir. Japonya'da 2005-2012 yılları arasında 40 farklı ilden toplanan 239 akar örneğinde mt-COI, 16S rRNA genleri ve ITS gen bölgelerini araştırılmışlardır. COI ve 16S rRNA nükleotid dizilerinde sırasıyla 28 ve 26 haplotip belirlemişlerdir. Filogenetik ağaçta A ve B şeklinde kümelenmiş hablogruplar daha önce bildirilmiştir. Araştırmacılar (94) A ve B hablogrupları sırasıyla AJ1, AJ2 ve BJ1, BJ2 olarak bölümlenmişler, filogenetik ağaç içerisinde AJ1 ve BJ2 haplotip dizilerinin diğer ülkelerde bildirilenlerden kısmen farklı olduğu ancak AJ2 ve BJ1'in ise Avrupa ülkeleri ile benzer olduğunu kaydetmişlerdir. Buna ek olarak ITS dizilerinin Avrupa ülkeleri ile benzer olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar (94) bu bulguların da *D. gallinae*'nin deniz aşırı ülkelere bulaşma olasılığını gösterdiğini rapor etmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 ARAŞTIRMA MATERYALİ VE AKAR ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Bu çalışmanın materyalini Kayseri’de bulunan bir yumurta tavukçuluğu işletmesinde tavuklarda görülen toplu ölümler üzerine Haziran-Temmuz 2014 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına intikal ettirilen ölü tavuklar (*Gallus gallus domesticus*) üzerinde belirlenen akar örnekleri oluşturmuştur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Tavuk üzerinde bulunan akarlar

Laboratuvara intikalleri sağlanan ölü tavuklar ivedilikle steril poşetlere konularak - 80°C’de bir gece bekletilmiş ve üzerlerindeki akarların ölmesi sağlanmıştır. Tavukların üzerinden ve steril poşetler içerisine geçmiş olan akarlar ince uçlu bir pens yardımıyla toplanarak %70 etil alkol içerisinde 1,5 ml’lik ependorflarda muhafaza altına alınmıştır.

3.2 MORFOLOJİK İDENTİFİKASYON

Toplanan akar örneklerinin tür ve gelişim dönemi bazlı morfolojik identifikasyonları stereo mikroskop altında ilgili teşhis anahtarlarına (5, 13) göre yapılmıştır. Entegre digital kamera sistemiyle morfolojik özellikler görüntülenmiş ve veriler kayıt altına alınmıştır. Akar örnekleri gelişim dönemlerine göre larva, nimf ve ergin olarak kategorize edilip protokol kayıtları gerçekleştirilmiş ve moleküler analizlere kadar %70 etil alkol içerisinde muhafaza edilmişlerdir.

3.3 MOLEKÜLER ANALİZLER

3.3.1 Genomik DNA İzolasyonu

%70 etil alkol içerisinde muhafaza edilen ve gelişme dönemlerine göre kategorize edilen akar örneklerinden genomik DNA izolasyonu moleküler filogenetik analizler için bireysel örnekler üzerinde, *Salmonella* türleri yönünden ise gelişim dönemli gruplanmış (10 adet/havuz) akar havuzlarında gerçekleştirilmiştir.

Akarlardan genomik DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır. %70'lik etil alkol solüsyonu içerisinde muhafaza edilen örneklerin her biri ve gruplanmış akar örnekleri önce steril DNA'se RNA'se free mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve üzerlerine sıvı azot ilave edilerek steril pestle ile toz haline getirilmiştir. Daha sonra tüplerin üzerine 20µl proteinase K ve 150 µl Buffer C-L ilave edilerek hemen 1dk vortekslenmiştir, 56°C'de 1 gece su banyosunda tutulmuştur. Tüplerden DNA ekstraksiyonu genomik DNA ekstraksiyon kiti (Axygen® AxyPrep™ Multisource Genomic Miniprep DNA) ile üreticinin açıklamalarına göre aşağıdaki gibi yapılmıştır.

- a) Kit içerisinde bulunan Eluent, önceden ısısı 65°C'ye ayarlanmış su banyosu içerisine konulmuştur.
- b) Tüpler üzerine 350 µl Buffer P-D eklenerek 30 sn vortekslenmiştir.
- c) Daha sonra tüpler 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- d) Her bir örnek için 2 ml'lik ependorf tüplerine (provided) miniprep kolon yerleştirilmiştir. Santrifüj işlemi sonucu üstte kalan süpernatant pipet yardımıyla

alınarak miniprep columnlar içerisine konularak 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

- e) Süre sonunda dibe çöken süpernatantlar dökülmüş ve miniprep columnlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirilmiştir. Miniprep columnlar içerisine ilk yıkama solüsyonu olan 500 µl Buffer W1 ilave edilerek 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- f) Miniprep columndan süzülerek ependorfun dibine çöken sıvı uzaklaştırılmış ve miniprep columnlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirilmiştir. Miniprep kolonlar içerisine 700 µl of Buffer W2 ilave edilerek 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve bu işlemler 2 kez tekrarlanmıştır.
- g) Yıkama işlemi sonucu dibe süzülen sıvı kısım uzaklaştırılarak miniprep columnlar boş ependorflar içerisine yerleştirilmiştir. Herhangi bir solüsyon eklenmeden boş tüpler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama solüsyonları içerisindeki etanolün tamamen uçması sağlanmıştır.
- h) Herbir örneğe ait miniprep columnlar 1,5 ml'lik yeni ependorf tüplerine yerleştirilmiştir. Üzerlerine, önceden 65°C'lik su banyosuna konulmuş olan eluent'den 50 µl ilave edilerek oda ısısında 1 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak genomik DNA elde edilmiştir. Elde edilen DNA'lar analize tabi tutulana kadar derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edilmiştir.

Elde edilen genomik DNA ekstraktlarından alınan örnekler Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek DNA izolasyon etkinliği ve total genomik DNA miktarları (ng/µl) belirlenmiştir.

3.3.2 Mt-COIGen Bölgesinin Amplifikasyonu

Akarlardan elde edilen genomik DNA ekstraktları mithocondrial cytochrome oxidase subunit I (mt-COI) gen bölgesinin yaklaşık 450 bp fragmentini amplifiye eden COX1F (5'-TGATTTTTTGGTCACCCAGAAG-3') ve COX1R (5'-TACAGCTCCTATAGAT AAAAC-3') primerleri ile PCR analizlerine tabii tutulmuştur (95).

Reaksiyon karışımı 25µl final konsantrasyonda; 2,5 µl 10XPCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0.4 µM her bir primer, 0.2 mM her bir dNTP, 2U Taq DNA polymerase ve 10-20ng template DNA olacak şekilde hazırlanmıştır.

Laminar kabin içerisinde steril şartlarda hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 0,5 ml'lik DNA'se ve RNA'se free ependorf tüpleri içerisinde konulmuştur. Tüpler thermalcycler cihazına (Thermo Hybaid) yerleştirilerek amplifikasyona tabi tutulmuştur.

Mt-COI gen bölgesinin amplifikasyonu için gerekli PCR şartları aşağıda verilmiştir (93).

- | | |
|--------------|-------------|
| 1. 94 °C 4dk | 1 siklus |
| 2. 94 °C 1dk | } 44 siklus |
| 3. 53 °C 1dk | |
| 4. 72 °C 1dk | |
| 5. 72 °C 4dk | 1 siklus |

PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak standardize edilmiş referans örneklerle ait genomik DNA'lar, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

3.3.3 Ribozomal ITS+gen bölgesinin amplifikasyonu

Ribozomal Internal Transcribed Spacer+ (18S rRNA,ITS-1, 5.8S, ITS-2, 28S rRNA) gen bölgesinin yaklaşık 560 bp fragmentini amplifiye eden ITSF (5'AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAG 3') ve ITSr (5'ATATGCTTAAATTCA GGGGG 3') primerleri ile PCR analizlerine tabii tutulmuştur (96).Reaksiyon karışımı 25µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 2,5 µl 10XPCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0.4 µM her bir primer, 0.2 mM her bir dNTP, 2U Taq DNA polymerase ve 10-20ng template DNA olacak şekilde hazırlanmıştır.

Amplifikasyon için uygulanan termal profil aşağıda gösterilmiştir (93).

- | | |
|--------------|-------------|
| 1. 94 °C 4dk | 1 siklus |
| 2. 93 °C 1dk | } 30 siklus |
| 3. 50 °C 1dk | |
| 4. 72 °C 1dk | |

PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak standardize edilmiş referans örneklerle ait genomik DNA'lar, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

3.3.4 *Salmonella* spp. 16S rRNA Geninin Amplifikasyonu

Elde edilen Gelişim dönemine göre gruplanmış akar havuzlarından izole edilen genomik DNA izolatlarında *Salmonella* spp.varlığının araştırılması amacıyla ilgili bakterinin 16S rDNA geninin yaklaşık 572 bp kısmını amplifiye eden 16SF (5' - TGGTGTGGTTAATAACCGCA-3') ve 16SR (5'-CACAAATCCATCTCTGGA-3') primerleriyle(97) PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı; 2,5 µl 10XPCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0.5µM her bir primer, 0.5 mM her bir dNTP, 1U Taq DNA polymerase ve 10-20ng template DNA olacak şekilde hazırlanmıştır.

16S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu için uygulanan termal profil aşağıda gösterilmiştir (97, 98).

- | | |
|-----------------|-------------|
| 1. 95 °C 10dk | 1 siklus |
| 2. 94 °C 1dk | } 37 siklus |
| 3. 65-58 °C 1dk | |
| 4. 58 °C 45 sn | |
| 5. 72 °C 1dk | |
| 5. 72 °C 5dk | |

PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak referans *Salmonella* spp. izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

3.3.5 PCR Ürünlerinin Elektroforezi

Mt-COI, ITS+ ve *Salmonella* 16S rRNA gen bölgesi yönünden PCR ile amplifikasyon sonucu elde edilen ampliconların görüntülenmesi amacıyla yatay elektroforez tankı (CLP) kullanılmıştır. Toplam hacim 1 lt olacak şekilde; 980 ml deiyonize su üzerine 20 ml 1XTAE (Tris-acetate-EDTA) buffer eklenerek elde edilen solüsyon, hem jel hazırlanmasında hem de elektroforez tankının içerisinde doldurulmasında kullanılmıştır. Ürünlerin görüntülenmesinde %1,5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin her birinden 10 µl alınıp 90 V'da 50 dk, jel elektroforeze tabii tutulmuştur. Sonuçlar Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.3.6 Klonlanma ve Plazmid Pürifikasyonu

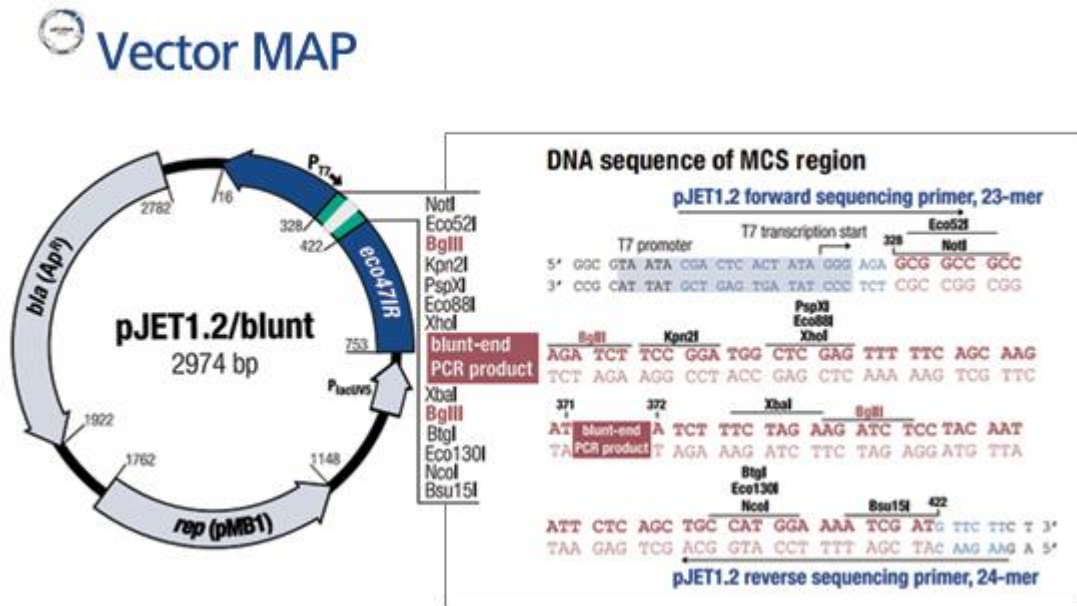
Mt-COI, ITS+ ve *Salmonella* 16S rRNA gen bölgeleri yönünden PCR analizlerinde pozitif belirlenen ve uygun konsantrasyonda olan izolatlardan seçilmiş ampliconlar ilgili gen bölgelerinin kayıpsız sekanslarının elde edilebilmesi amacıyla klonlanmış ve plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Uygulanan klonlama basamakları aşağıda verilmiştir.

Ligasyon basamağı: ITS+ ve mt-COI gen bölgelerinin PCR'ı sonucu jel üzerinde belirlenen ampliconlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Jel pürifiye örneklerin klonlanmasında CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Klonlama reaksiyonu kullanıcının önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanmış ve yapılmıştır:

2X Reaction Buffer	15 µl
PCR product (10 ng/ µl)	11,5 µl
DNA Blunting enzyme	1,5 µl
Toplam	18 µl

Hazırlanan karışım vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70 °C’de su banyosunda 5 dk inkübe edilerek hemen buz üstüne alınmıştır.

Karışım üzerine daha sonra 1 μ l pJET1.2/blunt CloningVector (50 ng/ μ l) ve 1 μ l T4 DNA Ligaz eklenerek son hacmi 20 μ l’ye tamamlanmıştır. Karışım 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 μ l’si transformasyon için kullanılmıştır. pJET1.2/blunt CloningVector haritası Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2.pJET1.2/blunt CloningVector Haritası

Transformasyon Basamağı: 5 μ L’lik ligasyon ürünü buz üzerinde tutulan *E. coli* TOP 10 hücrelerine eklendi ve buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. Karışım, önce 42°C’de 1 dk daha sonra buz üzerinde 2 dk bekletildikten sonra üzerine 250 μ L SOC Medium eklenmiştir. 37°C’de çalkalayıcı üzerinde 1.5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı LB (Lurie-Bertani) katı besiyerine ekilerek bir gece inkübe edilmiştir.

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerden steril pipet uçları ile alınarak yeniden LB katı besiyerine ekilmiş ve 37°C’de 1 gece daha inkübasyona bırakılmıştır.

Koloni Screening PCR: LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plasmidi içerip içermediğini anlamak için Koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR için 10 μ l ITaq

master mix'i, 0,4 µl pJET1.2 Forward ve pJET1.2 Reverse primerleri ile bir karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışıma katı besiyerinde üreyen kolonilerden steril pipet ucu ile alınan örnekler bulaştırılarak toplam 20 µL'lik karışımlar hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 95 °C'de 3 dk; 25 siklus, denaturation: 94 °C'de 30 s, annealing: 60 °C'de 30 s, extension: 72 °C'de 1 dk; final extension: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR sonucu elde edilen ampliconlar %1.5'luk agaroz jelde yürütölüp görüntülenmiştir.

Plazmid DNA: Pozitif bulunan kolonilerden plazmid DNA'sı elde etmek için LB katı besiyerinden steril özeler ile alınan koloniler ampicilinli 5 ml'lik LB sıvı besi yerlerine ekimi yapılarak 37°C'de sallayıcı üzerinde bir gece inkübe edilmiştir. Üreme gözlenen sıvı besi yerlerinden alınan örnekler 2 mL'lik ependorflar içerisine alınarak 6000g'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım dökölüp pelet daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

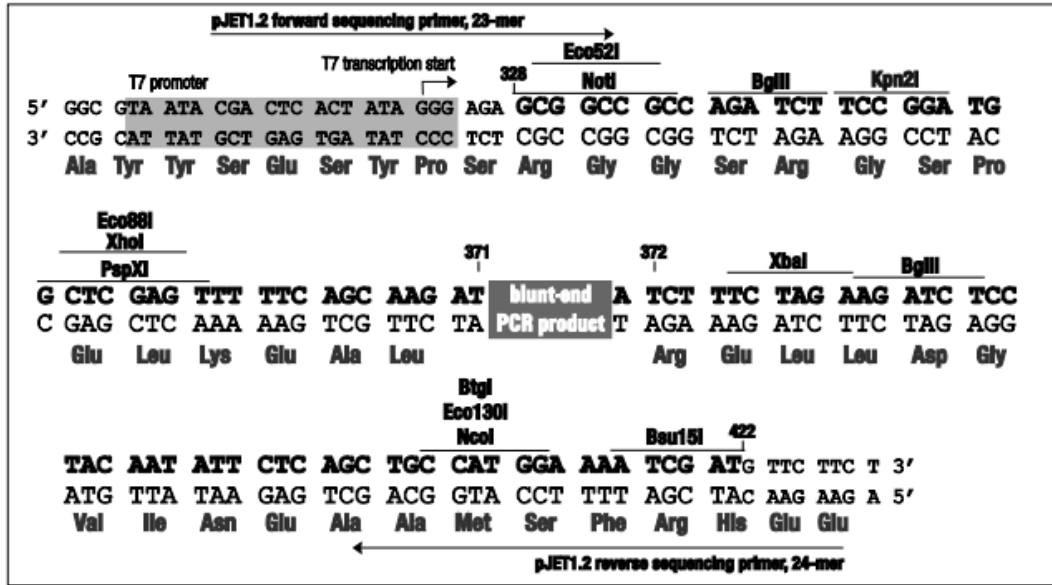
Peletten plazmid izolasyonu için Axygen plasmid pürifikasyon kit prosedürü takip edilmiştir. Axygen plasmid pürifikasyon ticari kitinin önerileri doğrultusunda plazmid ekstraksiyon işlemi şu şekilde yapılmıştır:

- 1- -20 °C'de saklanan peletin oda sıcaklığında çözünmesi sağlandıktan sonra üzerine 250 µl Buffer S1 eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- 2- Üzerine 250 µl Buffer S2 eklenmiş ve el ile 6 kez hafifçe çalkalanmıştır.
- 3- Daha sonra üzerine 350 µl Buffer S3 eklenmiş ve yine el yardımı ile hafifçe 8 kez çalkalanmıştır
- 4- Karışım daha sonra 12,000×g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir
- 5- Santrifüj sonrası supernatant alınıp AxyPrep Plasmid Miniprep column içine konulup 12,000×g'de 1 dk santrifüj yapılmıştır
- 6- Alttaki toplama tüpüne süzülen sıvı boşaltılmış ve üstteki Miniprep column tekrar aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir.
- 7- Yıkama amacıyla her bir Miniprep column üzerine 500 µl Buffer W1 ilave edilerek 12.000 ×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir

- 8- Santrifügasyondan sonra alta süzülen sıvı uzaklaştırılmış ve Miniprep column aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir
- 9- Tüp üzerine 700 µl Buffer W2 eklenerek 12.000 ×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu basamak 2 kez tekrar edilmiştir.
- 10- Toplama tüpüne süzülen sıvı tekrar uzaklaştırılmıştır. Miniprep column bu kez, yeni 2 ml'lik DNA'se RNA'se free bir tüp içerisine yerleştirilmiş ve membrana bağlanan Buffer W2'yi uzaklaştırmak için 12.000×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 11- Santrifüj sonrası Miniprep column temiz bir 1.5 ml'lik tüp içerisine yerleştirilmiş ve plasmid DNA'sı elde etmek amacıyla üzerine 60 µl Eluent eklenmiş ve oda ısında 1 dk beklendikten sonra 12.000 ×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 12- Santrifüj işlemi sonrası 1,5 ml'lik steril tüp içerisine süzülen sıvı plasmid DNA'sı, sekanslamaya gönderilinceye kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Restriksiyon ve PCR Analizleri: İzole edilen rekombinant plazmidler, restriksiyon enzimleri ile kesilerek ve vektör spesifik primerler ile PCR analizleri yapılarak klonlanan genin varlığı yönünden araştırılmıştır. Enzim kesimi için Aval ve XbaI (Thermo Scientific) enzimleri kullanılmıştır (Şekil 3.3). Elde edilen plazmid DNA'sını restriksiyon enzimleri ile kesmek için aşağıdaki oranlarda master mix hazırlanmıştır:

Steril PCR grade Su	14 µl
10X FastDigest® buffer	2 µl
DNA	4 µl
FastDigest® enzyme	1 µl
Toplam	20 µl



Şekil 3.3Aval ve XbaI (Thermo Scientific) enzimlerinin bağlanma noktaları

Karışım vortekslenmiş ve 37 °C’de 5 dk su banyosunda inkübe edildikten sonra %1.5’lik agaroz jele yüklenerek klonlanan genin varlığı yönünden incelenmiştir. Plasmid DNA’ların amplifikasyonu amacıyla pJET1.2 Forward (5’-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3’, Thermo Scientific) ve pJET1.2 Reverse (5’-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3’, Thermo Scientific) primerleri kullanılmış ve PCR sonrası amplikonlar % 1,5 ’luk agaroz jel üzerinde görüntülenmiştir.

3.3.7 Sekans ve Filogenetik Analizler

Mt-COI, ITS+ ve *Salmonella* 16S rRNA gen bölgeleri elde edilmiş olan plazmid DNA’lar pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 8.1.4 (99) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin pairwise alignmentları yapılarak, vektör DNA’sı ile kıyaslanmış, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlemiş ve izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra GenBank’ta mevcut homolog izolatlara ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla Geneious 8.1.4 (99) yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid farklılıkları belirlenmiştir. Filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde Maximum Likelihood (ML) ve Bayesian analizleri (BA) uygulanmıştır. ML analizleri Mega 6.0.6

(100) yazılımı üzerinden gerçekleştirilmiştir. ML analizlerinde sekans evrimi için en uygun modelin belirlenmesinde jModelTest 2 (101) kullanılmış ve en düşük Akaike Bilgi Kriteri (AIC) değerine sahip Tamura 3 Parameter + G+I modeli filogenetik ağaç oluşturulmasında kullanılmış, node güvenilirliğinin belirlenmesinde bootstrap replikasyon değeri 1000 alınmıştır. BA analizlerinde uygun model belirlenmesinde yine jModelTest 2 (101) kullanılmış ve en düşük Bayesian Bilgi Kriteri (BIC) değerine sahip General Time Reversible + Gamma distributed (GTR+G) modeli filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılmıştır. Bayesian analizleri Geneious 8.1.4 (99) yazılımı üzerinden MrBayes plugin (102) kullanılarak gerçekleştirilmiş, Markov Chain Monte Carlo taramaları 1.100,000 jenerasyon için 4 zincirle ve ağaç örnekleme her 200 jenerasyonda bir (ilk 100,000 ağaç “burn in” olarak çıkarılmıştır).

4. BULGULAR

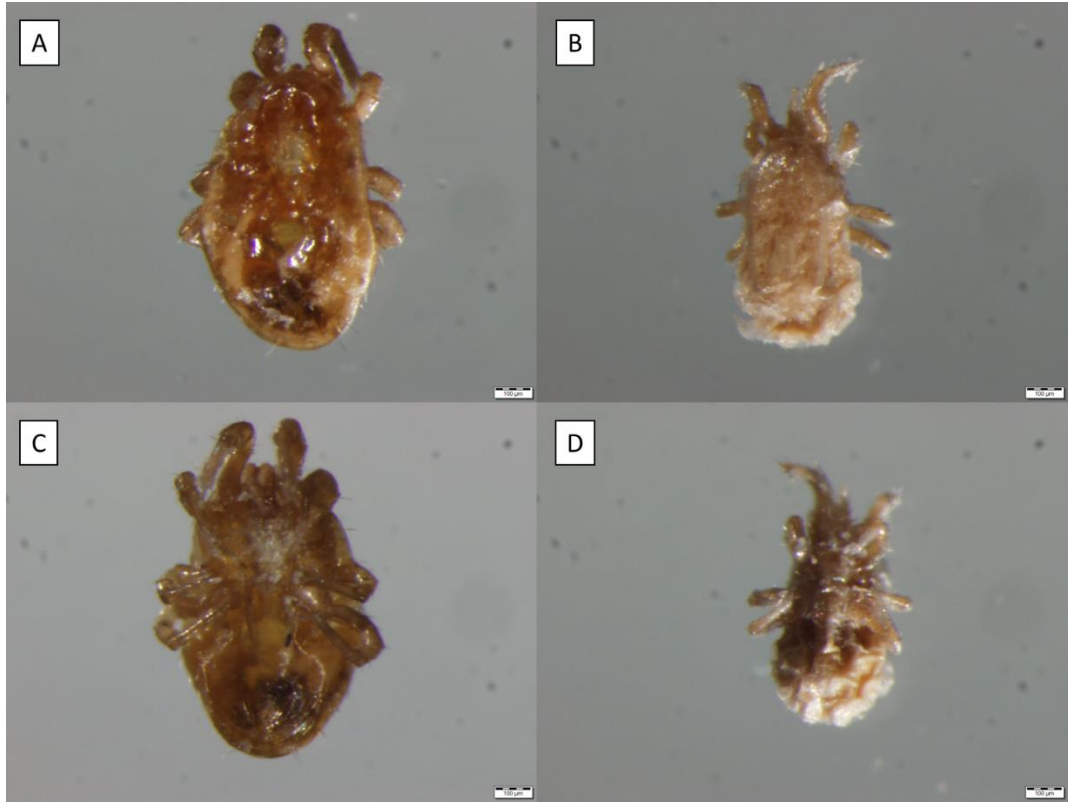
4.1 MORFOLOJİK İDENTİFİKASYON SONUÇLARI

Labratuvara getirilen toplam 8 ölü tavuk üzerinden 2750 adet akar toplanmıştır. Akarların gelişim dönemlerine göre dağılımı Tablo 4.1’de verilmiştir. Tüm akarlar morfometrik teşhis anahtarlarına göre *Dermanyssus gallinae* olarak identifiye edilmiştir.

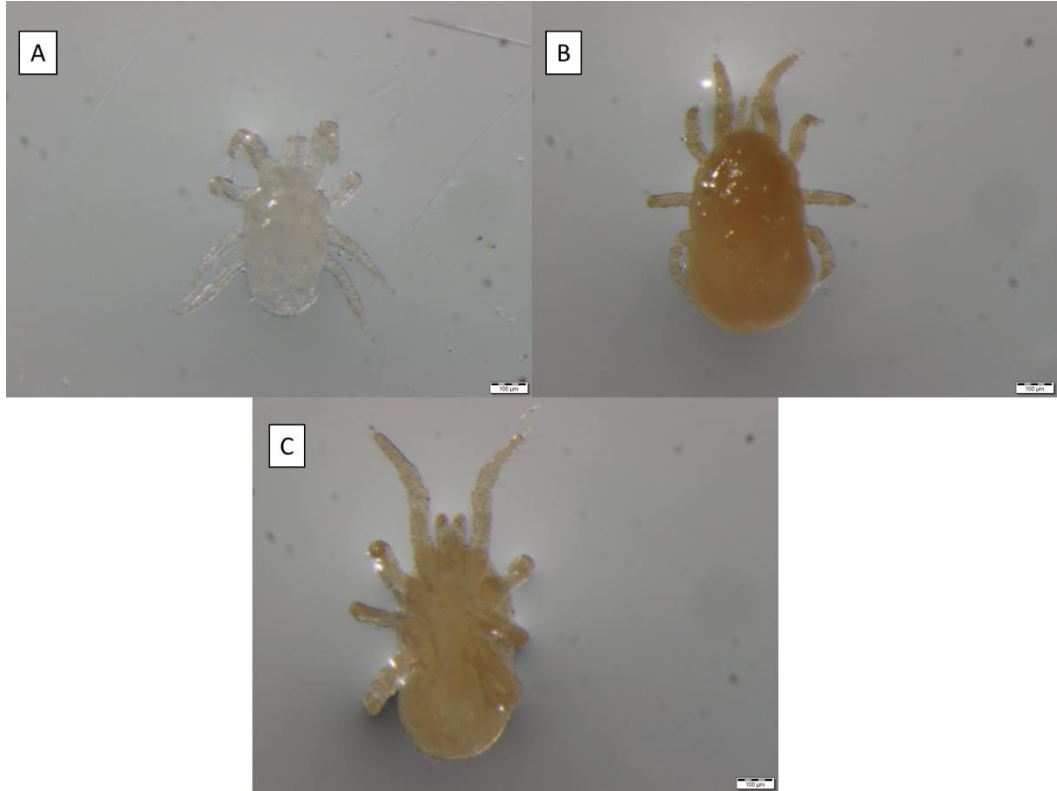
Tablo 4.1Ölü tavuklar üzerinde belirlenen *D. gallinae* akarlarının gelişim dönemlerine göre dağılımı

Tavuk No	Ergin	Nimf	Larva	Toplam
1	275	101	7	383
2	210	87	5	302
3	216	81	4	301
4	222	92	8	322
5	260	114	7	381
6	205	79	5	289
7	264	93	6	363
8	268	138	3	409
Toplam	1920	785	45	2750

İncelenen akarların vücudunun oval ve yassı olduğu ve üzerinin ince bir kitin tabakası ile kaplı olduğu görülmüştür. Kan emmeyen örneklerin beyaz renkte, kan emenlerin ise kırmızı-siyah renkte bulunduğu belirlenmiştir. Ergin (Şekil 4.1) ve nimflerde (Şekil 4.2) dört çift, larvalarda (Şekil 4.3) ise üç çift bacak gözlenmiştir.



Şekil 4.1Ergin *D. gallinae* Dorsal (A: Dişi, B: Erkek) ve Ventral Görüntüsü (C: Dişi, D: Erkek) (Orijinal)



Şekil 4.2*D. gallinae* Nimfleri Dorsal (A: Protonimf; B: Deutonymf) Ventral Görüntüsü (C: Deutonymf) (Orijinal)

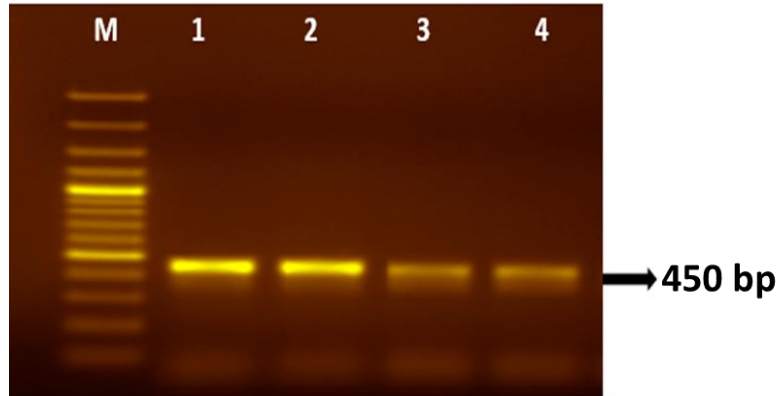


Şekil 4.3D. *D. gallinae* Larvası Ventral Görüntüsü (Orijinal)

4.2 MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI

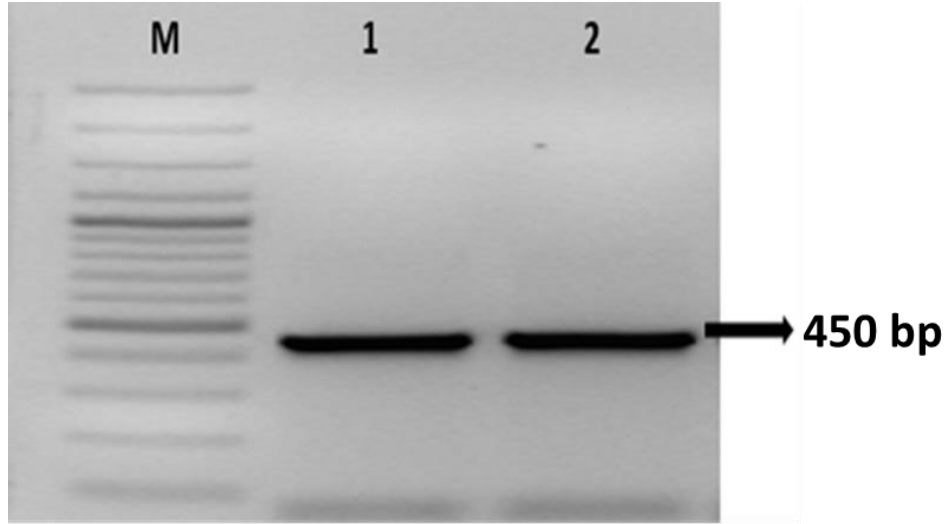
4.2.1 Mt-COI Gen Bölgesi Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları

Morfolojik identifikasyonları sağlanan *D. gallinae* gelişim dönemlerinden seçilen örneklerle ait genomik DNA izolatlarının mt-COI gen bölgesini hedef alan primerlerle amplifikasyonu sonucu hedef büyüklükte ampliconlar belirlenmiştir. Bazı örneklerle ait mt-COI gen bölgesi ampliconlarının agaroz jel üzerinde görünüşleri Şekil 4.4’de verilmiştir.



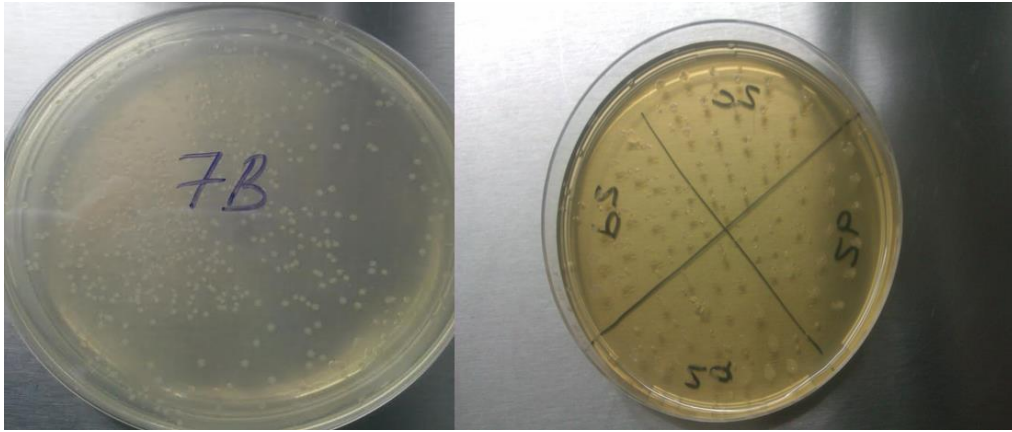
Şekil 4.4D. *D. gallinae* örneklerine ait genomik DNA izolatlarının mt-COI gen bölgesini amplifiye eden COX1F ve COX1R primerleri ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü M: Marker; 1,2: Ergin, 3: Nimf, 4: Larva

Uygun konsantrasyonda belirlenen toplam 7 izolata (ait 3 ergin, 3 nimf, 1 larva) ait amplikonlar sekans analizleri için jel pürifiye edilmiş (Şekil 4.5) ve plazmid pürifikasyonu için ayrılmıştır.

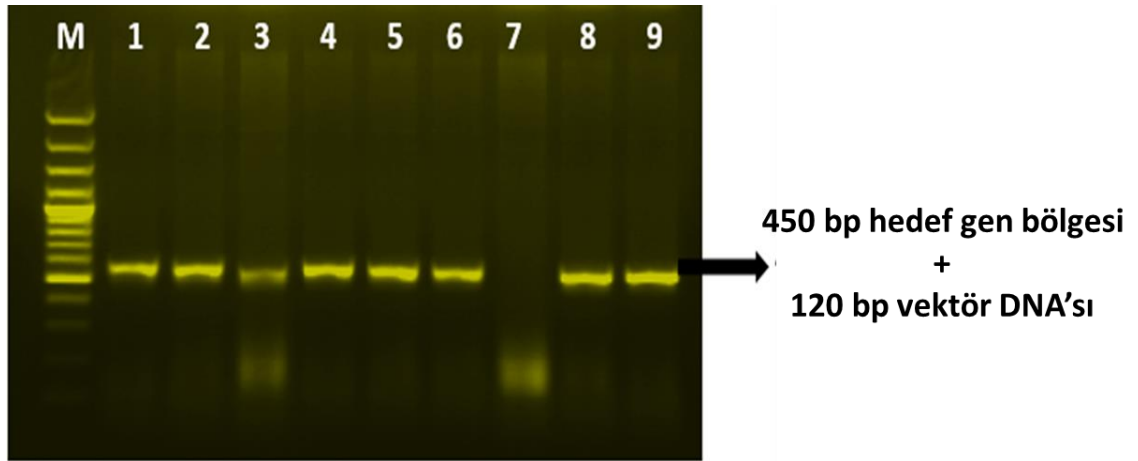


Şekil 4.5 Sekans analizleri için seçilen bazı izolatların mt-COI gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel pürifiye edilen örneklerin jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1: Ergin, 2: Nimf

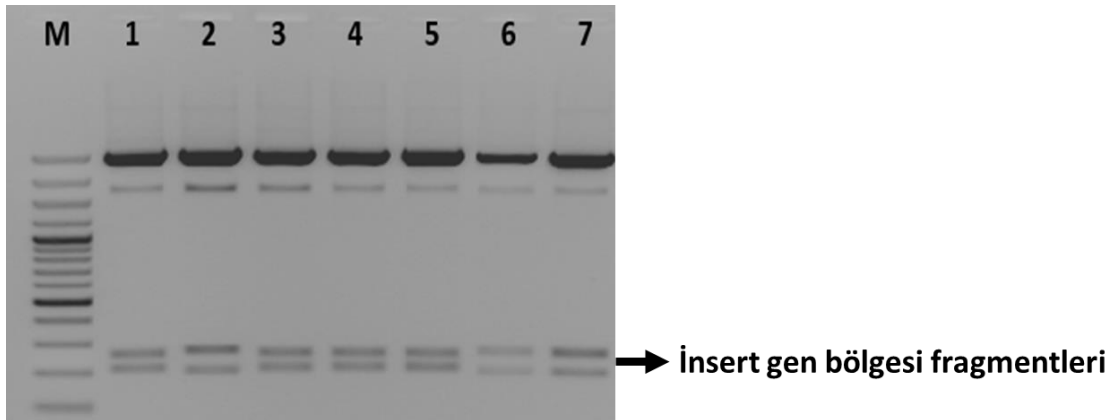
Jel pürifiye edilen amplikonların klonlanması sonucu katı besi yerinde üreyen kolonilerden seçilen tek koloniler, transformasyon etkinliğini artırmak amacıyla steril pipet uçları ile alınıp ayrı ayrı tekrar LB katı besi yerine ekilmiştir (Şekil 4.6). Bölümlenmiş kolonilerden seçilen tek koloniler vektör spesifik primerlerle PCR analizlerine tabii tutulmuş ve hedef gen bölgelerinin vektör DNA'sına insert olduğu koloniler belirlenerek (Şekil 4.7) sıvı besi yerine aktarılmış ve sonrasında plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmidlerde hedef insert genlerin konfirmasyonu Aval ve XbaI (Thermo Scientific) enzimleriyle restrüksiyon analizleri (Şekil 4.8) sonucu yapılmıştır.



Şekil 4.6 LB katı besi yerinde üreyen 1. Ve 2. inkübasyon basamakları sonucu oluşan koloniler



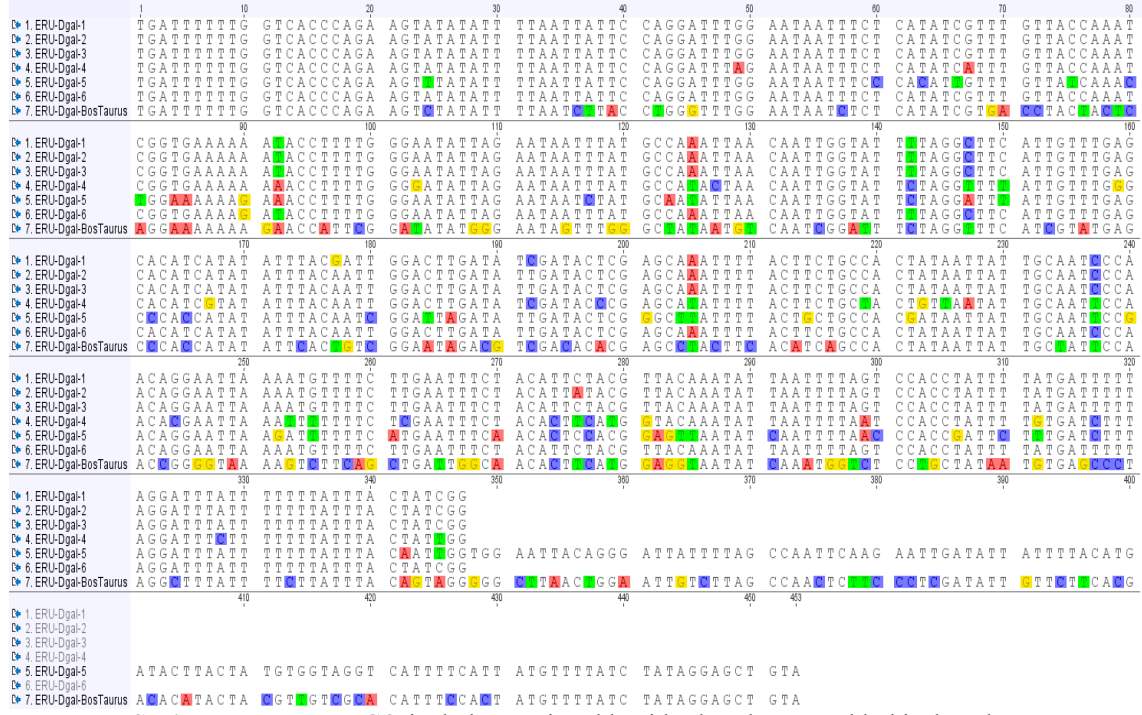
Şekil 4.7 Transforme hücrelerde mt-COI gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu ampliconların jel agarozda görünümü. M: Marker (100bp); 1-6,8,9: Insert mt-COI gen bölgesi



Şekil 4.8 Saflaştırılan plazmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu insert mt-COI gen bölgesi fragmentlerinin agaroz jelde görünümü. M: Marker (100bp); 1-7: Insert mt-COI gen bölgesi

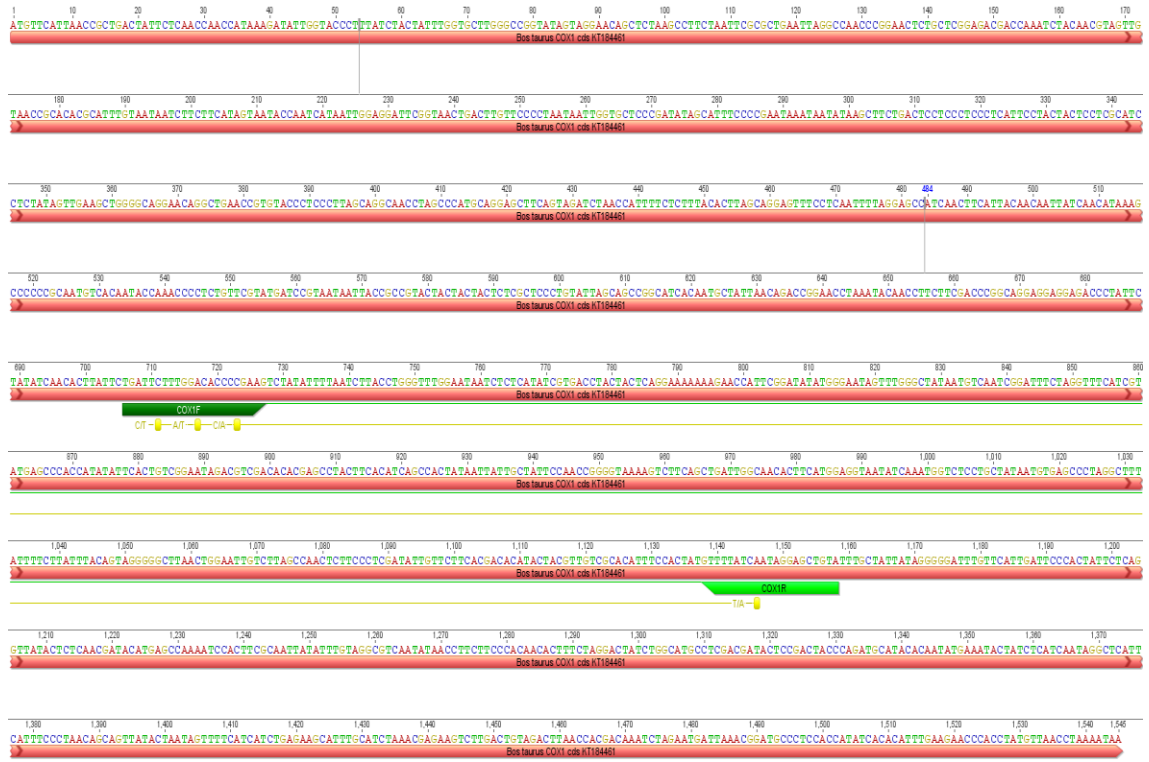
Sekans analizlerine dahil edilen 7 adet örneğe ait plazmid DNA izolatlarının elde edilen nükleotid sekans kromtogramları dikkatlice analiz edilmiş ve forward ve reverse dizilimlerin ikili hizalamaları ile hedef gen bölgesi dizilimleri plazmid DNA'sı içerisinde izole edilerek karakterize edilmiştir. Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle

belirlenen izolatların nükleotid dizilimleri çoklu hizalama analizleriyle birlikte Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9 Saptanan mt-COI izolatlarına ait nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları

Şekil 4.9’da görüldüğü üzere bir izolata ait mt-COI sekansının (ERU-Dgal-BosTaurus) diğerlerinden oldukça farklılık gösterdiği dikkati çekmiştir. Nitekim bu izolatın GenBank üzerinden yapılan blastn analizlerinde hedef tür *D. gallinae*’ye ait olmadığı, sığır mt-COI gen bölgesi izolatlarıyla %99,1 identiklik gösterdiği belirlenmiştir. Nitekim mt-COI gen bölgesi amplifikasyonunda kullanılan COX1F ve COX1R primerlerinin sığır mt-COX1 gen bölgesinin amplifikasyonu açısından uyumluluğu incelendiğinde Şekil 4.10’da görüleceği üzere forward dizilimde 3, reverse dizimde ise 1 baz uyumsuzluğu belirlenmesine karşın optimum annealing ısısında aynı büyüklükte (453 bp) amplifikasyon gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 4.10Mt-COI gen bölgesi amplifikasyonunda kullanılan COX1F ve COX1R primerlerinin sığır mt-COX1 gen bölgesinin amplifikasyonu açısından uyumluluğu

Mt-COI gen bölgesi yönünden sekans analizleriyle karakterize edilen izolatlara, *D. gallinae* gelişim dönemleri ve GenBank aksesyon numaralarıyla birlikte Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2Mt-COI gen bölgesine göre karakterize edilenizolatların tür, DNA izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları

İzolat	Tür	DNA izolasyon kaynağı (<i>D. gallinae</i>)	GenBank Aksesyon
ERU-Dgal-1	<i>D. gallinae</i>	Ergin	KU866543
ERU-Dgal-2	<i>D. gallinae</i>	Nimf	KU866544
ERU-Dgal-3	<i>D. gallinae</i>	Nimf	KU866545
ERU-Dgal-4	<i>D. gallinae</i>	Larva	KU866546

ERU-Dgal-5	<i>D. gallinae</i>	Nimf	KU866541
ERU-Dgal-6	<i>D. gallinae</i>	Ergin	KU866547
ERU-Dgal-BosTaurus	<i>BosTaurus</i>	Ergin	KU866542

Mt-COI gen bölgesine göre belirlenen izolatların nükleotid kompozisyonları Tablo 4.3’de verilmiştir. *D. gallinae* olarak karakterize edilen izolatların mt-COI gen bölgesi sekans analiz sonuçları 68 değişken bölge ve 279 identik bölgenin varlığını ortaya koymuştur. Saptanan izolatların yüksek AT baz içeriğine (%72,1) sahip olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.3 Mt-COI gen bölgesine göre *D. gallinae* olarak karakterize edilen izolatların nükleotid kompozisyonları

İzolat	T(U)	C	A	G	T+A	C+G	Toplam Baz
ERU-Dgal-6	42,1	14,1	30,5	13,3	72,6	27,4	347,0
ERU-Dgal-5	40,2	14,1	30,2	15,5	70,4	29,6	453,0
ERU-Dgal-4	42,4	15,0	29,4	13,3	71,8	28,2	347,0
ERU-Dgal-3	42,1	14,1	30,8	13,0	72,9	27,1	347,0
ERU-Dgal-2	42,1	13,8	31,1	13,0	73,2	26,8	347,0
ERU-Dgal-1	41,8	14,4	30,5	13,3	72,3	27,7	347,0
Ortalama	41,7	14,3	30,4	13,6	72,1	27,9	364,7

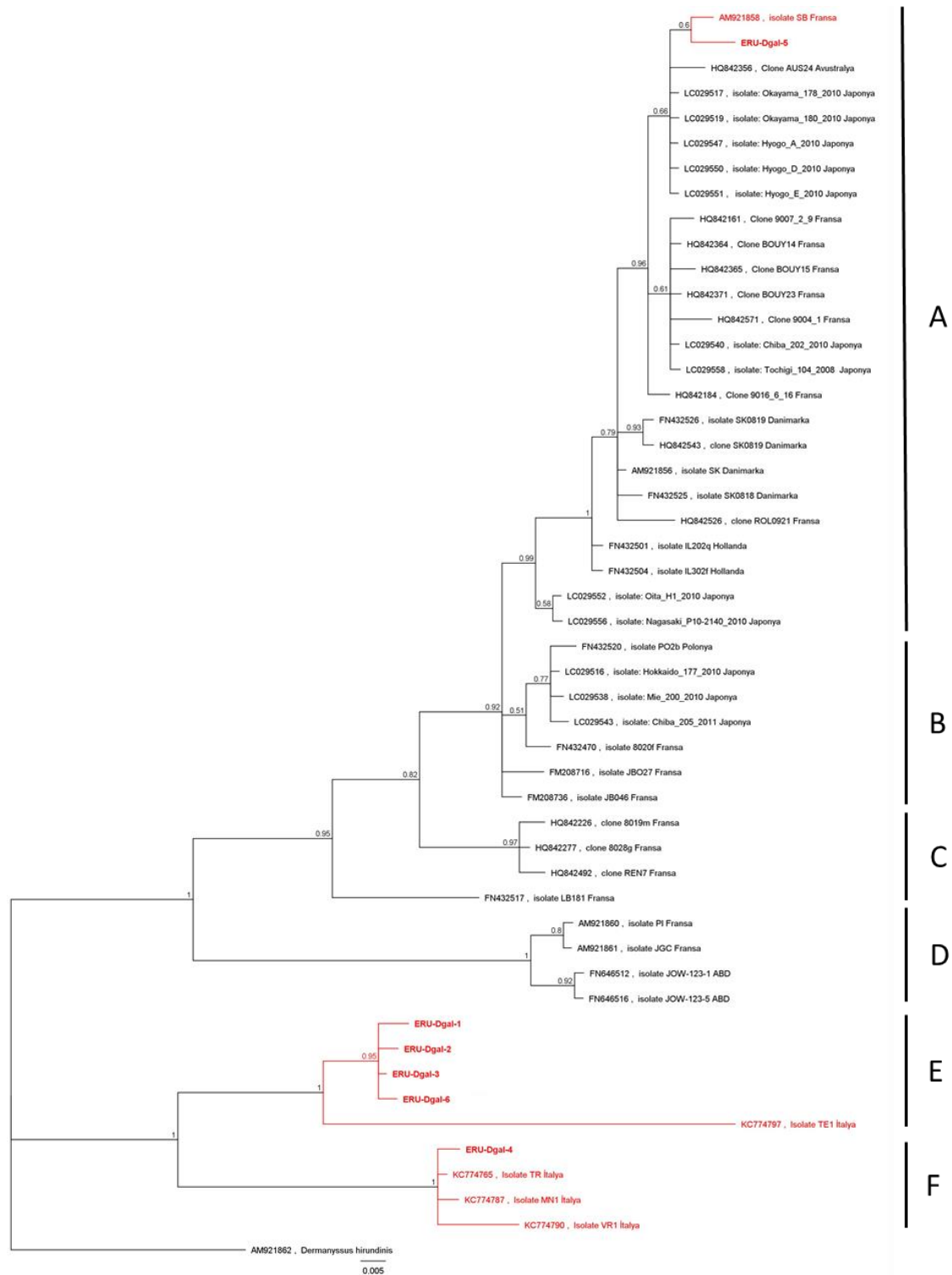
4.2.2 Mt-COI Gen Bölgesi Filogenetik Analiz Sonuçları

Filogenetik analizler sonucu Mt-COI filogenetik analizlerine çalışmada elde edilen izolatlarla birlikte GenBank’ta mevcut olan Avustralya, Japonya, Fransa, İtalya, Danimarka, Hollanda, Polonya ve Amerika Birleşik Devletlerinden farklı haplogruplarda yer alan toplam 49 izolat dahil edilmiş monofiletik dış grup olarak *Dermanyssus hirundinis* (GenBank aksesyon: AM921862) kullanılmıştır. Filogenetik analize dahil edilen izolatların pairwise identiklik oranları Tablo 4.4’de verilmiştir. Bayesiyan filogenisine göre oluşturulan ağaç üzerinde (Şekil 4.11) görüleceği üzere analize dahil edilen izolatlarda 6 haplogrup (A-F) içersinde toplam 28 haplotipin varlığı görülmüştür. Araştırmada saptanan izolatlar arasındaki intraspesifik sekans heterojenitesi %10,2±0,2 belirlenmiştir. ERU-Dgal-1, ERU-Dgal-2, ERU-Dgal-3 ve ERU-Dgal-6 izolatları en yüksek identikliği İtalya’da izole edilmiş TE1 izolatıyla (GenBank aksesyon: KC774797) göstermiş (Tablo 4.4) ve ilgili izolatla birlikte kümelenerek E haplogrubunda yer almıştır (Şekil 4.11). ERU-Dgal-4 izolatı en yüksek identikliği yine İtalya’dan izole edilmiş TR ve MN1 izolatlarıyla (Genbank aksesyon: KC774765, KC774787) (Tablo 4.4)

göstermiş ve ilgili izolatlarla birlikte F haplogrubunda yer aldığı görülmüştür (Şekil 4.11). Araştırmada belirlenen yukarıdaki izolatlardan daha uzak bulunan ERU-Dgal-5 izolatu ise en yüksek identikliği Fransa'dan izole edilmiş SB izolatıyla göstermiş olup (Tablo 4.4) en geniş haplogrubu oluşturan A haplogrubunda yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 4.11).

Tablo 4.4Mt-COI gen bölgesine filogenetik analize dahil edilen izolatların pairwise identiklik oranları

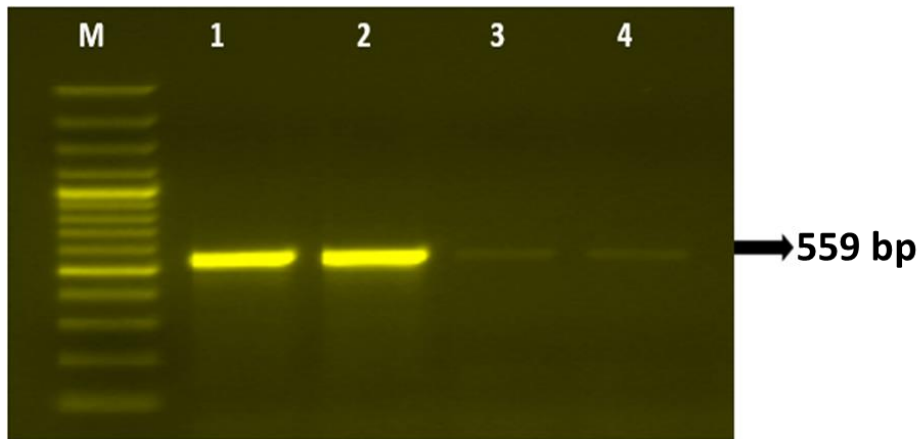
	AM021856	AM021858	AM021860	AM021861	AM021862	EU-D ₁	EU-D ₂	EU-D ₃	EU-D ₄	EU-D ₅	FM208716	FM208736	FM343240	FM432501	FM432504	FM432517	FM432520	FM432526	FM445512	FM445516	HQ041161	HQ041184	HQ042206	HQ042277	HQ042356	HQ042364	HQ042365	HQ042371	HQ042402	HQ042526	HQ042543	HQ042571	KC774765	KC774767	KC774790	KC774797	LC020516	LC020517	LC020519	LC020538	LC020540	LC020543	LC020547	LC020550	LC020551	LC020552	LC020556	LC020558			
AM021856		98.2%	96.3%	97.1%	97.1%	95.0%	95.3%	95.6%	93.8%	97.6%	95.9%	97.1%	97.4%	96.7%	99.6%	99.6%	92.5%	96.3%	99.6%	99.6%	96.4%	96.5%	98.8%	99.2%	94.2%	94.5%	98.3%	99.2%	98.8%	99.2%	94.2%	98.8%	99.6%	98.3%	83.5%	83.5%	95.6%	79.9%	97.3%	99.0%	99.0%	96.7%	99.3%	97.3%	99.0%	99.0%	99.0%	98.0%	98.0%	99.2%	
AM021858	98.2%		95.1%	95.8%	95.8%	94.4%	94.7%	95.0%	93.2%	98.8%	95.3%	96.3%	96.5%	95.8%	97.9%	97.9%	91.7%	95.4%	97.9%	97.9%	95.0%	95.3%	97.9%	98.3%	93.3%	93.8%	98.3%	98.3%	98.8%	98.3%	93.3%	97.1%	97.9%	97.9%	82.4%	82.4%	93.9%	79.1%	96.0%	99.3%	99.3%	95.7%	98.7%	96.3%	99.3%	99.3%	99.3%	97.6%	97.6%	98.4%	
AM021860	96.3%	95.1%		100%	96.8%	94.2%	94.5%	94.8%	93.0%	95.7%	94.5%	99.6%	99.6%	90.8%	98.8%	98.8%	91.3%	95.6%	98.3%	98.3%	98.1%	96.7%	98.3%	97.9%	90.8%	91.3%	97.9%	98.3%	97.9%	98.8%	99.8%	95.6%	98.3%	89.2%	82.5%	82.5%	92.9%	77.7%	97.3%	96.0%	96.0%	98.0%	96.3%	98.0%	96.0%	96.0%	96.0%	97.3%	97.3%	97.7%	
AM021861	97.1%	95.8%	100%		96.8%	94.9%	95.2%	95.5%	94.0%	96.5%	95.2%	99.6%	99.6%	90.8%	98.8%	98.8%	91.3%	95.6%	98.3%	98.3%	98.1%	96.7%	98.3%	97.9%	90.8%	91.3%	97.9%	98.3%	97.9%	98.8%	99.8%	95.6%	98.3%	89.2%	83.7%	83.7%	94.1%	78.3%	97.3%	96.0%	96.0%	98.0%	96.3%	98.0%	96.0%	96.0%	97.3%	97.3%	97.7%		
AM021862	97.1%	95.8%	96.8%	96.8%		98.1%	98.7%	98.7%	96.8%	96.5%	98.4%	98.8%	99.5%	99.0%	99.2%	99.2%	96.0%	98.8%	99.6%	99.2%	95.7%	96.2%	99.0%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.2%	96.8%	99.2%	99.0%	99.0%	96.1%	96.1%	95.7%	80.9%	97.3%	97.0%	97.0%	97.0%	97.3%	97.3%	97.0%	97.0%	97.0%	97.6%	97.6%	99.7%
EU-D ₁	95.9%	94.4%	94.2%	94.9%	98.1%		99.1%	99.4%	99.5%	95.3%	99.1%	96.7%	96.8%	96.7%	95.4%	95.4%	95.8%	96.3%	95.4%	95.4%	94.0%	94.3%	96.3%	95.8%	95.8%	96.3%	95.4%	95.8%	96.3%	95.8%	95.8%	97.1%	95.4%	96.3%	89.3%	89.9%	97.1%	98.6%	95.9%	93.7%	93.7%	94.7%	94.0%	95.0%	93.7%	93.7%	93.7%	94.3%	94.3%	96.1%	
EU-D ₂	95.3%	94.7%	94.5%	95.2%	98.7%	99.1%		99.7%	99.5%	95.6%	99.4%	97.5%	97.7%	97.5%	96.3%	96.3%	96.7%	97.1%	96.7%	96.3%	94.3%	94.6%	97.1%	96.7%	96.7%	97.1%	96.7%	96.7%	97.1%	96.7%	97.9%	96.3%	97.1%	99.3%	98.9%	97.1%	98.6%	95.3%	94.0%	94.0%	95.0%	94.3%	95.3%	94.0%	94.0%	94.0%	94.7%	94.7%	96.9%		
EU-D ₃	95.6%	95.4%	94.8%	95.5%	98.7%	99.4%	99.7%		99.5%	95.9%	99.7%	97.5%	97.7%	97.5%	96.3%	96.3%	96.7%	97.1%	96.7%	96.3%	94.7%	95.2%	97.1%	96.7%	96.7%	97.1%	96.7%	96.7%	97.1%	96.7%	97.9%	96.3%	97.1%	99.3%	98.9%	97.1%	98.6%	95.7%	94.3%	94.3%	95.7%	94.7%	94.3%	94.3%	94.3%	95.6%	95.6%	96.9%			
EU-D ₄	93.8%	93.2%	93.0%	94.0%	96.8%	99.5%	99.5%	99.5%		94.4%	99.2%	95.0%	94.6%	95.0%	93.8%	93.8%	96.7%	94.6%	94.2%	93.8%	93.0%	93.5%	93.8%	94.2%	93.8%	93.8%	94.2%	93.8%	93.8%	94.2%	93.8%	93.8%	95.4%	93.8%	93.8%	99.0%	99.3%	97.5%	99.4%	93.7%	93.7%	94.0%	93.0%	93.7%	93.2%	92.3%	92.3%	93.7%	93.7%	93.2%	
EU-D ₅	97.6%	96.8%	95.7%	96.5%	96.5%	95.3%	95.6%	95.9%	94.4%		96.2%	96.3%	97.4%	95.8%	97.1%	97.1%	91.7%	95.4%	97.5%	97.1%	95.7%	96.2%	97.9%	96.3%	92.9%	93.3%	98.8%	97.5%	97.9%	97.5%	92.9%	97.1%	97.1%	96.7%	93.2%	93.2%	94.6%	79.3%	96.9%	96.7%	96.7%	95.7%	98.0%	96.3%	96.7%	98.7%	97.6%	97.6%	97.6%		
EU-D ₆	95.9%	95.3%	94.5%	95.2%	98.4%	99.1%	99.4%	99.7%	99.2%	96.2%		97.9%	98.2%	97.9%	96.7%	96.7%	96.3%	97.5%	97.1%	96.7%	94.3%	94.8%	97.5%	97.1%	97.1%	97.5%	97.1%	97.5%	97.1%	97.5%	96.7%	97.5%	98.9%	98.6%	97.5%	98.6%	96.9%	94.7%	94.7%	95.7%	95.3%	96.0%	94.7%	94.7%	94.7%	95.3%	95.3%	97.3%			
FM208716	97.1%	96.3%	96.4%	99.6%	98.8%	96.7%	97.5%	97.5%	95.0%	96.3%	97.9%		99.1%	98.3%	97.9%	97.5%	92.5%	97.9%	96.7%	96.7%	99.5%	99.2%	95.8%	96.3%	95.0%	96.3%	95.0%	96.3%	95.8%	96.3%	95.0%	96.3%	95.8%	96.3%	95.8%	96.3%	95.0%	96.3%	95.8%	96.3%	95.0%	96.3%	95.8%	96.3%	95.0%	96.3%	95.8%	96.3%	95.0%		
FM208736	97.4%	96.5%	99.0%	99.9%	99.5%	96.8%	97.7%	97.7%	94.6%	97.4%	98.2%	99.1%		98.7%	97.8%	97.8%	97.8%	96.8%	96.7%	96.7%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%	97.8%		
FM343240	96.7%	95.8%	99.8%	99.8%	99.0%	96.7%	97.0%	97.5%	95.0%	95.8%	97.9%	98.7%	98.7%		97.1%	97.1%	94.2%	98.8%	96.3%	96.3%	98.8%	96.4%	96.3%	95.8%	96.7%	96.3%	96.7%	95.8%	96.3%	95.8%	96.7%	96.3%	96.7%	95.8%	96.3%	95.8%	96.3%	95.0%	95.0%	97.3%	79.2%	99.2%	96.7%	96.7%	99.2%	96.7%	96.7%	98.3%	98.3%	96.7%	
FM432501	99.6%	97.9%	98.8%	98.8%	99.2%	95.4%	96.3%	96.7%	93.8%	97.1%	96.7%	97.5%	97.8%	100%		92.1%	96.7%	99.2%	99.2%	97.7%	98.3%	98.3%	98.8%	94.6%	95.0%	97.9%	98.8%	98.3%	98.8%	94.6%	95.0%	97.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%		
FM432504	99.6%	97.9%	98.8%	98.8%	99.2%	95.4%	96.3%	96.7%	93.8%	97.1%	96.7%	97.5%	97.8%	92.1%	96.7%		92.1%	96.7%	99.2%	99.2%	97.7%	98.3%	98.3%	98.8%	94.6%	95.0%	97.9%	98.8%	98.3%	98.8%	94.6%	95.0%	97.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%		
FM432517	92.5%	91.7%	91.3%	91.3%	90.0%	95.8%	96.7%	96.7%	91.7%	96.3%	92.5%	93.4%	94.2%	92.1%	92.1%	92.1%	92.9%	96.2%	96.8%	92.9%	92.5%	92.9%	93.3%	92.5%	92.5%	92.1%	92.5%	92.9%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	
FM432520	96.3%	95.4%	99.6%	99.6%	98.8%	96.3%	97.1%	97.1%	94.0%	95.4%	97.5%	97.9%	98.2%	98.8%	96.7%	96.7%	95.8%	99.5%	99.2%	99.2%	95.0%	95.4%	94.6%	95.0%	95.4%	95.4%	95.0%	95.4%	94.6%	95.0%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%		
FM432526	99.6%	97.9%	98.8%	98.8%	99.2%	95.4%	96.3%	96.7%	93.8%	97.1%	96.7%	97.5%	97.8%	92.1%	95.8%	96.7%	92.1%	96.7%	99.2%	99.2%	97.7%	98.3%	98.3%	98.8%	94.6%	95.0%	97.9%	98.8%	98.3%	98.8%	94.6%	95.0%	97.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%	93.9%		
FM445512	96.4%	96.5%	98.8%	99.2%	94.2%	98.8%	99.6%	99.6%	90.8%	98.8%	98.8%	91.3%	95.6%	98.3%	98.3%	98.1%	96.7%	98.3%	97.9%	98.3%	97.9%	98.8%	99.8%	95.6%	98.3%	89.2%	83.7%	83.7%	94.1%	78.3%	97.3%	96.0%	96.0%	98.0%	96.3%	98.0%	96.0%	96.0%	98.0%	96.3%	98.0%	96.0%	96.0%	97.3%	97.3%	97.7%	97.7%	97.7%			
HQ041161	99.2%	94.2%	94.5%	98.3%	99.2%	98.8%	99.2%	94.2%	98.8%	99.6%	99.2%	95.7%	96.2%	99.0%	99.2%	99.2%	96.0%	98.8%	99.6%	99.2%	95.7%	96.2%	99.0%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.2%	96.8%	99.2%	99.0%	99.0%	96.1%	96.1%	95.7%	80.9%	97.3%	97.0%	97.0%	97.0%	97.3%	97.3%	97.0%	97.0%	97.0%	97.6%	97.6%	99.7%
HQ041184	99.2%	94.2%	94.5%	98.3%	99.2%	98.8%	99.2%	94.2%	98.8%	99.6%	99.2%	95.7%	96.2%	99.0%	99.2%	99.2%	96.0%	98.8%	99.6%	99.2%	95.7%	96.2%	99.0%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.2%	96.8%	99.2%	99.0%	99.0%	96.1%	96.1%	95.7%	80.9%	97.3%	97.0%	97.0%	97.0%	97.3%	97.3%	97.0%	97.0%	97.0%	97.6%	97.6%	99.7%
HQ042206	94.2%	93.3%	93.8%	99.8%	99.8%	95.8%	96.7%	96.7%	93.8%	92.9%	97.1%	95.0%	95.0%	95.0%	94.6%	94.6%	93.9%	94.6%	93.9%	96.8%	96.4%	94.2%	93.8%		99.6%	93.8%	94.2%	93.8%	94.2%	93.8%	94.2%	93.8%	93.8%	96.1%	96.1%	97.3%	95.9%	94.2%	94.2%	95.0%	94.2%	94.2%	94.2%	94.2%	94.2%	94.2%	95.0%	95.0%	94.2%		
HQ042277	94.5%	93.8%	91.3%	91.3%	90.0%	95.8%	96.7%	96.7%	91.7%	96.3%	92.5%	93.4%	94.2%	92.1%	92.1%	92.1%	92.9%	96.2%	96.8%	92.9%	92.5%	92.9%	93.3%	92.5%	92.5%	92.1%	92.5%	92.9%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	92.5%	
HQ042356	98.3%	99.2%	98.8%	99.2%	94.2%	98.8%	99.6%	99.6%	90.8%	98.8%	98.8%	91.3%	95.6%	98.3%	98.3%	98.1%	96.7%	98.3%	97.9%	98.3%	97.9%	98.8%	99.8%	95.6%	98.3%	89.2%	83.7%	83.7%	94.1%	78.3%	97.3%	96.0%	96.0%	98.0%	96.3%	98.0%	96.0%	96.0%	98.0%	96.3%	98.0%	96.0%	96.0%	97.3%	97.3%	97.7%	97.7%	97.7%			
HQ042364	98.3%	99.2%	98.8%	99.2%	94.2%	98.8%	99.6%	99.6%	90.8%	98.8%	98.8%	91.3%	95.6%	98.3%	98.3%	98.1%	96.7%	98.3%	97.9%	98.3%	97.9%	98.8%	99.8%	95.6%	9																										



Şekil 4.11D. *gallinae* izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) analizine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen izolatlar kırmızı ve kalın karakterde yerleştikleri kümeler kırmızı renkte gösterilmiştir. Node'ların önündeki rakamlar Bayesian olasılığını göstermektedir. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

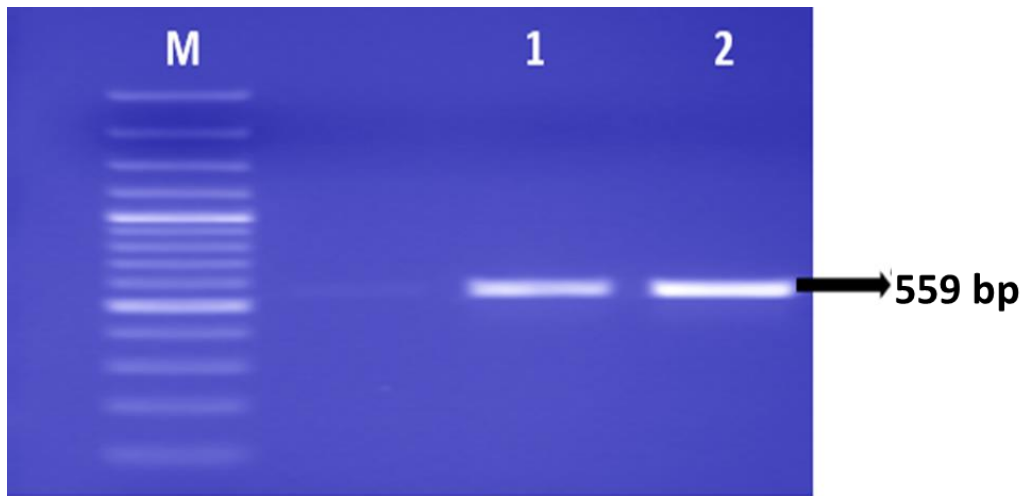
4.2.3 Ribozomal ITS+ Gen Bölgesi Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları

Mt-COI gen bölgesinde olduğu gibi gelişim dönemlerinden seçilen örneklerle ait genomik DNA izolatlarının ITS+ (18S rRNA parsiyel; ITS-1, 5.8S rRNA, ITS-2 complete; 28S rRNA parsiyel) gen bölgesini hedef alan primerlerle amplifikasyonu sonucu hedef büyüklükte ampliconlar saptanmıştır. Bazı örneklerle ait ITS+ gen bölgesi ampliconlarının agaroz jel üzerinde görünüşleri Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



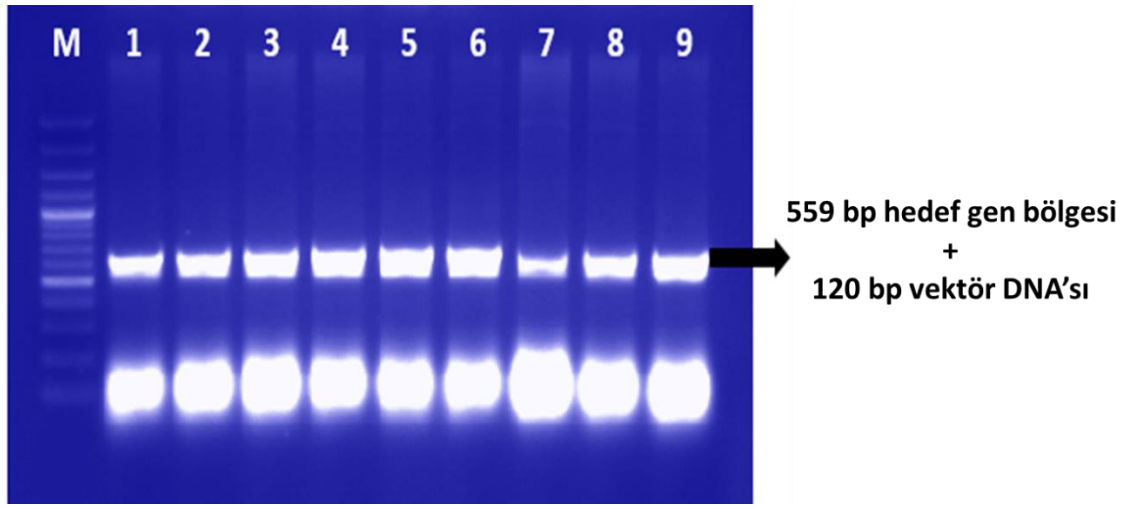
Şekil 4.12D. *gallinae* örneklerine ait genomik DNA izolatlarının ITS+ gen bölgesini amplifiye eden ITSF ve ITSr primerleri ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü M: Marker; 1,2: Ergin, 3: Nimf, 4: Larva

Mt-COI gen bölgesi sekans analizleri için belirlenmiş aynı izolatlarla birlikte toplam 7 amplicon sekans analizleri için jel pürifiye edilmiş (Şekil 4.13) ve plazmid pürifikasyonu için ayrılmıştır.

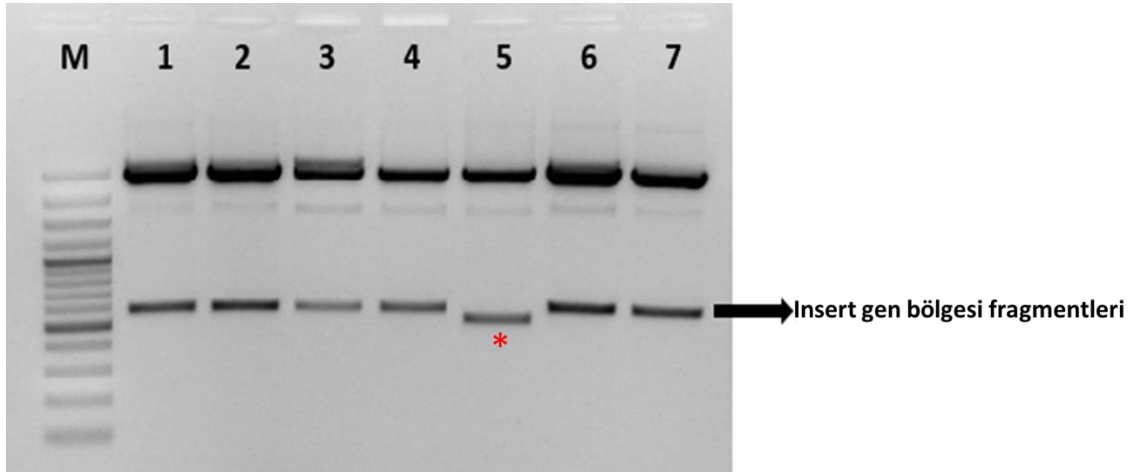


Şekil 4.13 Sekans analizleri için seçilen bazı izolatların ITS+ gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel pürifiye edilen örneklerin jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1: Ergin, 2: Nimf

Jel pürifiye edilen ampikonların klonlanması sonucu mt-COI gen bölgesinde olduğu gibi bölümlenmiş kolonilerden seçilen tek koloniler vektör spesifik primerlerle PCR analizlerine tabii tutulmuş ve hedef gen bölgelerinin vektör DNA'sına insert olduğu koloniler belirlenerek (Şekil 4.14) sıvı besiyerine aktarılmış ve sonrasında plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmidlerde hedef insert genlerin konfirmasyonu Aval ve XbaI (Thermo Scientific) enzimleriyle restriksiyon analizleri (Şekil 4.15) sonucu yapılmıştır. PCR ve restriksiyon analizlerinde bir örneğe ait plazmid DNA'nın farklı büyüklükte bant profili gösterdiğidikkati çekmiştir.

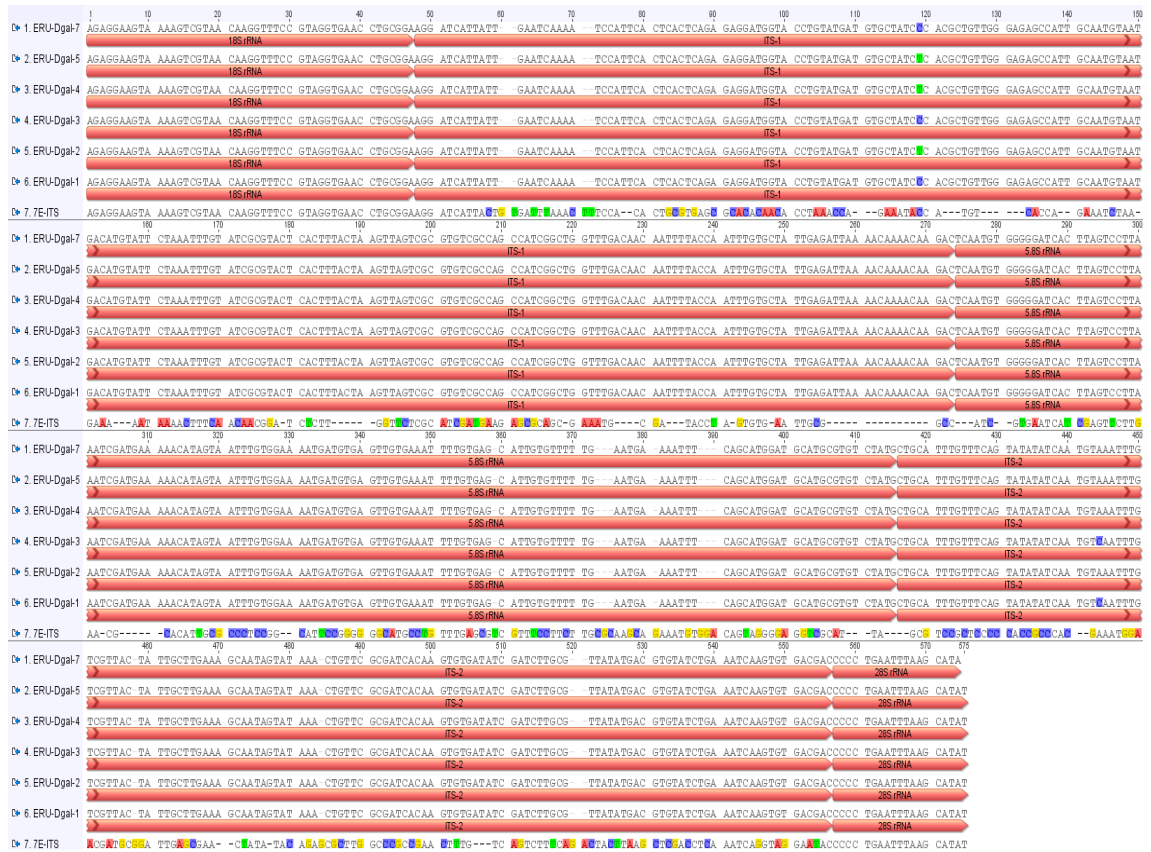


Şekil 4.14 Transforme hücrelerde ITS-2 gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu ampikonların jel agarozda görünümü. M: Marker (100bp); 1-9: İnter ITS-2 gen bölgesi



Şekil 4.15 Saflaştırılan plazmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu insert ITS+gen bölgesi fragmentlerinin agaroz jelde görünümü. M: Marker (100bp); 1-4,6,7: İnter ITS+gen bölgesi; 5: Farklı profilde insert olmuş gen bölgesi

Sekans analizlerine dahil edilen 7 adet örneğe ait plazmid DNA izolatlarının elde edilen nükleotid sekans kromtogramları dikkatlice analiz edilmiş ve forward ve reverse dizilimlerin ikili hizalamaları ile hedef gen bölgesi dizilimleri plazmid DNA'sı içerisinde izole edilerek karakterize edilmiştir. ITS+ gen bölgesi sekans analizleriyle belirlenen izolatların nükleotid dizilimleri çoklu hizalama analizleriyle birlikte Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16 Saptanan ITS+ izolatlarına ait nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları

Şekil 4.16'da görüldüğü üzere restrüksiyon analizlerinde de farklı bant profili sergileyen bir izolata ait sekansın (7E-ITS) diğerlerinden oldukça farklılık gösterdiği dikkati çekmiştir. Nitekim bu izolatin GenBank üzerinden yapılan blastn analizlerinde hedef tür *D. gallinae*'ye ait olmadığı ve *Pichia* soyundaki mantar izolatlarıyla yüksek identiklik (%94,7) gösterdiği belirlenmiştir.

ITS+ gen bölgesi yönünden sekans analizleriyle karakterize edilen izolatlar, *D. gallinae* gelişim dönemleri ve GenBank aksesyon numaralarıyla birlikte Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.5ITS+ gen bölgesine göre karakterize edilen izolatların tür, DNA izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları

İzolat	Tür	DNA izolasyon kaynağı (<i>D. gallinae</i>)	GenBank Aksesyon
ERU-Dgal-1	<i>D. gallinae</i>	Ergin	KU866535
ERU-Dgal-2	<i>D. gallinae</i>	Nimf	KU866536
ERU-Dgal-3	<i>D. gallinae</i>	Nimf	KU866537
ERU-Dgal-4	<i>D. gallinae</i>	Larva	KU866538
ERU-Dgal-5	<i>D. gallinae</i>	Nimf	KU866539
ERU-Dgal-7	<i>D. gallinae</i>	Ergin	KU866540
7E-ITS	<i>Pichiaspp.</i>	Ergin	-

ITS+ gen bölgesine göre belirlenen izolatların nükleotid kompozisyonları ise Tablo 4.6’da sunulmuştur. *D. gallinae* olarak karakterize edilen izolatların ITS+ gen bölgesi sekans analiz sonuçları 2 değişken bölge ve 557 (%99,6) identik bölgenin varlığını ortaya koymuştur. Saptanan izolatların GT baz içeriğine oranla yüksek AT baz içeriğine (%61,9) sahip olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.6ITS+ gen bölgesine göre *D. gallinae* olarak karakterize edilen izolatların nükleotid kompozisyonları

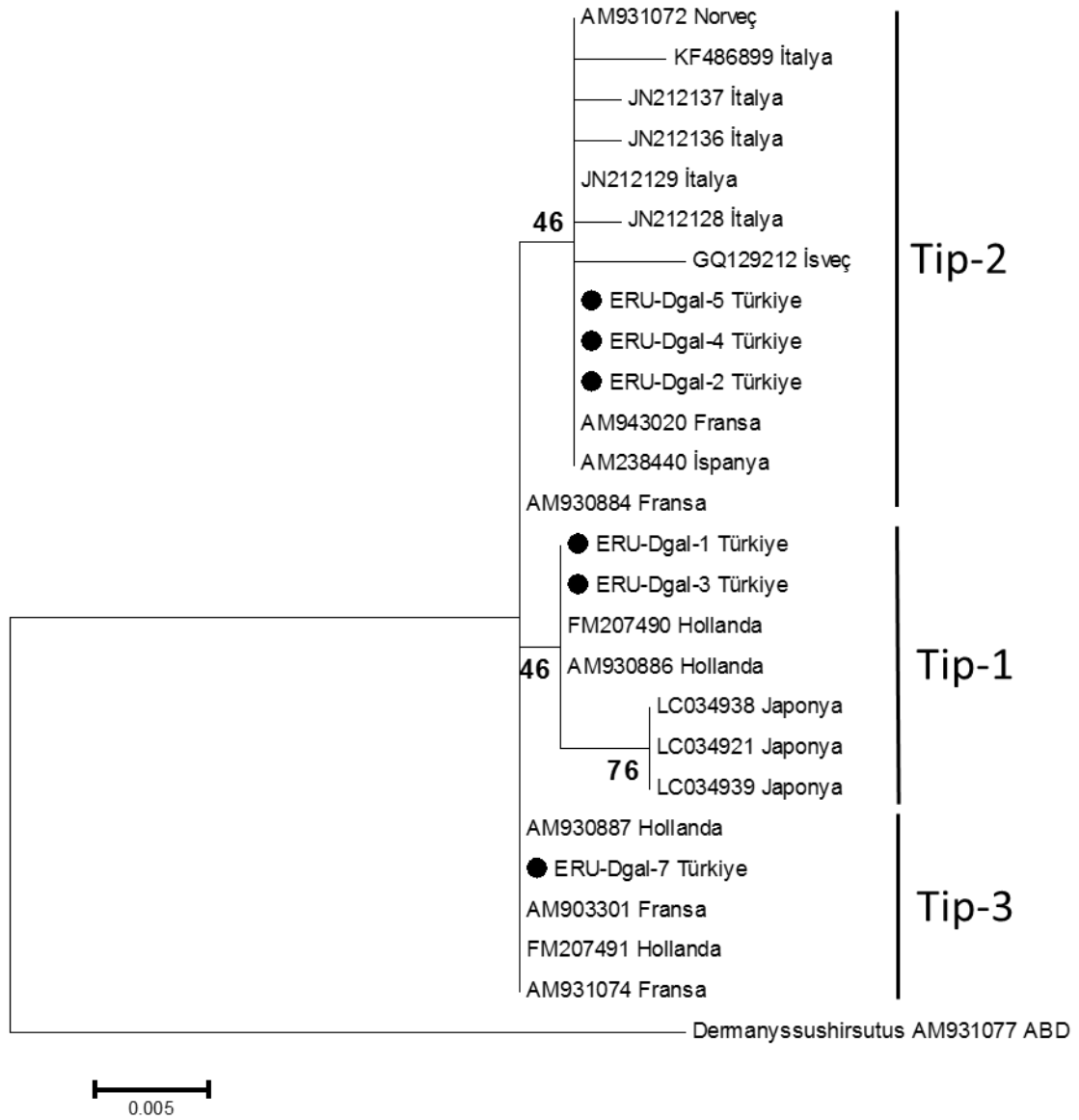
İzolat	T(U)	C	A	G	T+A	C+G	Toplam baz sayısı
ERU-Dgal-7	31,7	16,3	30,1	21,9	61,8	38,2	558,0
ERU-Dgal-5	32,0	16,1	30,1	21,8	62,1	37,9	559,0
ERU-Dgal-4	32,0	16,1	30,1	21,8	62,1	37,9	559,0
ERU-Dgal-3	31,8	16,5	29,9	21,8	61,7	38,3	559,0
ERU-Dgal-2	32,0	16,1	30,1	21,8	62,1	37,9	559,0
ERU-Dgal-1	31,8	16,5	29,9	21,8	61,7	38,3	559,0
Ortalama	31,9	16,3	30,0	21,8	61,9	38,1	558,8

4.2.4 ITS+ Gen Bölgesi Filogenetik Analiz sonuçları

ITS+ filogenetik analizlerine çalışmada elde edilen izolatlarla birlikte GenBank'ta mevcut olan Norveç, İtalya, İsveç, Fransa, İspanya, Hollanda ve Japonya'dan farklı haplogruplarda yer alan toplam 25 izolat dahil edilmiş monofiletik dış grup olarak *Dermanyssus hirsutus* (GenBank aksesyon: AM931077) kullanılmıştır. Filogenetik analize dahil edilen izolatların pairwise identiklik oranları Tablo 4.7'de verilmiştir. ML filogenisine göre oluşturulan ağaç üzerinde (Şekil 4.17) görüleceği üzere analize dahil edilen izolatlarda 3 filogenetik grup (Tip-1-3) içerisinde toplam 6 haplotipin varlığı görülmüştür. Araştırmada karakterize edilen ITS+ nükleotid sekanslarında yalnızca biri ITS-1 (115. baz, Şekil 4.16) diğeri ise ITS-2 gen bölgesinde (432. baz, Şekil 4.16) olmak üzere iki variable bölge belirlenmiştir. Tip 1 grup olarak nitelenen ilgili bazlardaki sırasıyla C, C yerleşimi ERU-Dgal-1 ve ERU-Dgal-3 izolatlarında belirlenmiş ve bu izolatlar filogenetik ağaç üzerinde de görüleceği üzere (Şekil 4.17) ilgili Hollanda ve Japonya izolatlarıyla kümelenme göstermiştir. Tip-2 grup olarak nitelenen ilgili bazlardaki sırasıyla T, A yerleşimi ERU-Dgal-2, ERU-Dgal-4 ve ERU-Dgal-5 izolatlarında saptanmış ve bu izolatlar da ilgili Norveç, İtalya, İsveç, Fransa ve İspanya izolatlarıyla aynı kümede yer almıştır (Şekil 4.17). ERU-Dgal-7 izolatının ilgili bazlarında ise sırasıyla C, A yerleşimi belirlenmiş ve bu izolat Hollanda ve Fransa'dan bildirilen ilgili izolatlarla Tip-3 grup içerisinde kümelenme göstermiştir (Şekil 4.17). ITS+ filogenetik analizlerine göre incelenen izolatlar arasında genetik diversite $0,3 \pm 0,2$ olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.7ITS+ gen bölgesine filogenetik analize dahil edilen izolatların pairwise identiklik oranları

	AM238440	AM903301	AM930884	AM930886	AM930887	AM931072	AM931074	AM943020	ERU-Dgal-1	ERU-Dgal-2	ERU-Dgal-3	ERU-Dgal-4	ERU-Dgal-5	ERU-Dgal-7	FM207490	FM207491	GQ129212	JN212128	JN212129	JN212136	JN212137	KF486899	LC034921	LC034938	LC034939	Dermanyssus hirsutus AM9...
AM238440		99.7%	99.7%	99.4%	99.7%	100%	99.7%	100%	99.4%	100%	99.4%	100%	100%	99.7%	99.4%	99.6%	100%	99.7%	100%	100%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	99.4%	91.5%
AM903301	99.7%		100%	99.7%	100%	99.7%	100%	99.7%	99.7%	99.7%	99.7%	99.7%	100%	99.7%	99.9%	99.7%	99.4%	99.7%	99.7%	99.7%	99.2%	98.9%	99.7%	99.7%	99.7%	91.8%
AM930884	99.7%	100%		99.7%	100%	99.7%	100%	99.7%	99.7%	99.7%	99.7%	100%	99.7%	99.9%	99.7%	99.9%	99.7%	99.4%	99.7%	99.7%	99.2%	98.9%	99.7%	99.7%	99.7%	91.8%
AM930886	99.4%	99.7%	99.7%		99.7%	99.4%	99.7%	99.4%	100%	99.4%	100%	99.4%	99.4%	99.7%	100%	99.9%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	98.9%	98.6%	100%	100%	100%	91.5%
AM930887	99.7%	100%	100%	99.7%		99.7%	100%	99.7%	99.7%	99.7%	99.7%	99.7%	100%	99.7%	99.9%	99.7%	99.4%	99.7%	99.7%	99.7%	99.2%	98.9%	99.7%	99.7%	99.7%	91.8%
AM931072	100%	99.7%	99.7%	99.4%	99.7%		99.7%	100%	99.4%	100%	99.4%	100%	100%	99.7%	99.4%	99.6%	100%	99.7%	100%	100%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	99.4%	91.3%
AM931074	99.7%	100%	100%	99.7%	100%	99.7%		99.7%	99.7%	99.7%	99.7%	99.7%	100%	99.7%	99.9%	99.7%	99.4%	99.7%	99.7%	99.7%	99.1%	98.9%	99.7%	99.7%	99.7%	91.6%
AM943020	100%	99.7%	99.7%	99.4%	99.7%	100%	99.7%		99.4%	100%	99.4%	100%	100%	99.7%	99.4%	99.6%	100%	99.7%	100%	100%	99.4%	99.1%	99.4%	99.4%	99.4%	91.0%
ERU-Dgal-1	99.4%	99.7%	99.7%	100%	99.7%	99.4%	99.7%	99.4%		99.4%	100%	99.4%	99.4%	99.7%	100%	99.9%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	98.9%	98.6%	100%	100%	100%	91.5%
ERU-Dgal-2	100%	99.7%	99.7%	99.4%	99.7%	100%	99.7%	100%	99.4%		99.4%	100%	100%	99.7%	99.4%	99.6%	100%	99.7%	100%	100%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	99.4%	91.5%
ERU-Dgal-3	99.4%	99.7%	99.7%	100%	99.7%	99.4%	99.7%	99.4%	100%	99.4%		99.4%	99.4%	99.7%	100%	99.9%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	98.9%	98.6%	100%	100%	100%	91.5%
ERU-Dgal-4	100%	99.7%	99.7%	99.4%	99.7%	100%	99.7%	100%	99.4%	100%	99.4%		100%	99.7%	99.4%	99.6%	100%	99.7%	100%	100%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	99.4%	91.5%
ERU-Dgal-5	100%	99.7%	99.7%	99.4%	99.7%	100%	99.7%	100%	99.4%	100%	99.4%	100%		99.7%	99.4%	99.6%	100%	99.7%	100%	100%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	99.4%	91.5%
ERU-Dgal-7	99.7%	100%	100%	99.7%	100%	99.7%	100%	99.7%	99.7%	99.7%	99.7%	99.7%	99.7%		99.7%	99.9%	99.7%	99.4%	99.7%	99.7%	99.2%	98.9%	99.7%	99.7%	99.7%	91.8%
FM207490	99.4%	99.7%	99.7%	100%	99.7%	99.4%	99.7%	99.4%	100%	99.4%	100%	99.4%	99.4%	99.7%		99.9%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	98.9%	98.6%	100%	100%	100%	91.5%
FM207491	99.6%	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%	99.6%	99.9%	99.6%	99.9%	99.6%	99.9%	99.6%	99.6%	99.9%	99.9%		99.6%	99.3%	99.6%	99.6%	99.0%	98.8%	99.9%	99.9%	99.9%	91.6%
GQ129212	100%	99.7%	99.7%	99.4%	99.7%	100%	99.7%	100%	99.4%	100%	99.4%	100%	100%	99.7%	99.4%	99.6%		99.7%	100%	100%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	99.4%	91.5%
JN212128	99.7%	99.4%	99.4%	99.2%	99.4%	99.7%	99.4%	99.7%	99.2%	99.7%	99.2%	99.7%	99.7%	99.4%	99.2%	99.3%	99.7%		99.7%	99.7%	99.2%	98.9%	99.2%	99.2%	99.2%	91.2%
JN212129	100%	99.7%	99.7%	99.4%	99.7%	100%	99.7%	100%	99.4%	100%	99.4%	100%	100%	99.7%	99.4%	99.6%	100%	99.7%		100%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	99.4%	91.5%
JN212136	100%	99.7%	99.7%	99.4%	99.7%	100%	99.7%	100%	99.4%	100%	99.4%	100%	100%	99.7%	99.4%	99.6%	100%	99.7%	100%		99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	99.4%	91.5%
JN212137	99.4%	99.2%	99.2%	98.9%	99.2%	99.4%	99.1%	99.4%	98.9%	99.4%	98.9%	99.4%	99.4%	99.2%	98.9%	99.0%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%		98.6%	98.9%	98.9%	98.9%	90.9%
KF486899	99.2%	98.9%	98.9%	98.6%	98.9%	99.2%	98.9%	99.1%	98.6%	99.2%	98.6%	99.2%	99.2%	98.9%	98.6%	98.8%	99.2%	98.9%	99.2%	99.2%	98.6%		98.6%	98.6%	98.6%	90.8%
LC034921	99.4%	99.7%	99.7%	100%	99.7%	99.4%	99.7%	99.4%	100%	99.4%	100%	99.4%	99.4%	99.7%	100%	99.9%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	98.9%	98.6%		100%	100%	91.5%
LC034938	99.4%	99.7%	99.7%	100%	99.7%	99.4%	99.7%	99.4%	100%	99.4%	100%	99.4%	99.4%	99.7%	100%	99.9%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	98.9%	98.6%	100%		100%	91.5%
LC034939	99.4%	99.7%	99.7%	100%	99.7%	99.4%	99.7%	99.4%	100%	99.4%	100%	99.4%	99.4%	99.7%	100%	99.9%	99.4%	99.2%	99.4%	99.4%	98.9%	98.6%	100%	100%		91.5%
Dermanyssus hirsutus AM9...	91.5%	91.8%	91.8%	91.5%	91.8%	91.3%	91.6%	91.0%	91.5%	91.5%	91.5%	91.5%	91.5%	91.8%	91.5%	91.6%	91.5%	91.2%	91.5%	91.5%	90.9%	90.8%	91.5%	91.5%	91.5%	



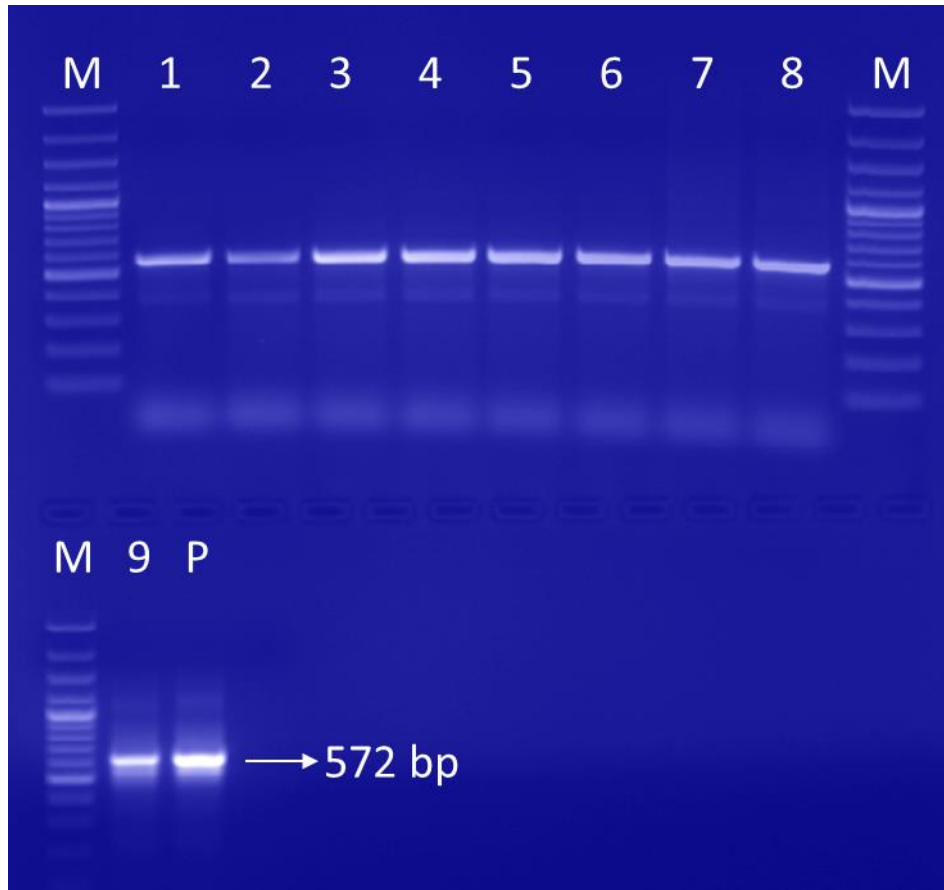
Şekil 4.17 *D. gallinae* izolatlarının ITS+ gen bölgesi Maximum Likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen izolatlar ● karakteriyle gösterilmiştir. Node'ların önündeki rakamlar ML bootstrap 1000 desteğini göstermektedir. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

4.2.5 *Salmonella* spp. 16S rRNA Gen Bölgesi Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları

D. gallinae gelişim dönemleri bazında oluşturulmuş toplam 38 genomik DNA havuzunun 9'unda (%23,7) 16S rRNA gen bölgesini parsiyel olarak amplifiye eden primerlerle PCR analizleri sonucu *Salmonella* spp. pozitifliği belirlenmiştir (Şekil 4.18). İncelenen ve *Salmonella* spp. yönünden pozitif belirlenen havuzların *D. gallinae* gelişim dönemlerine göre dağılımı Tablo 4.8'de verilmiştir.

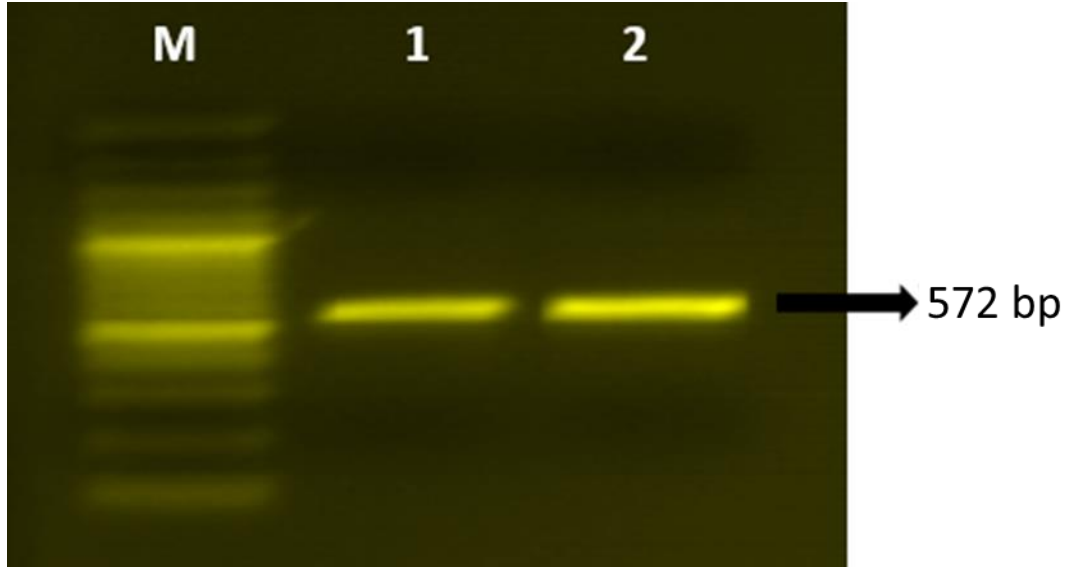
Tablo 4.8 *Salmonella* spp. yönünden incelenen *D. gallinae* genomik DNA havuzlarında belirlenen pozitiflikler

<i>D. gallinae</i> Gelişim Dönemi	İncelenen Genomik DNA Havuzu Sayısı (10 örn/havuz)	Pozitif Genomik DNA Havuzu Sayısı
Ergin	20	5
Nimf	15	3
Larva	3	1
Toplam	38	9



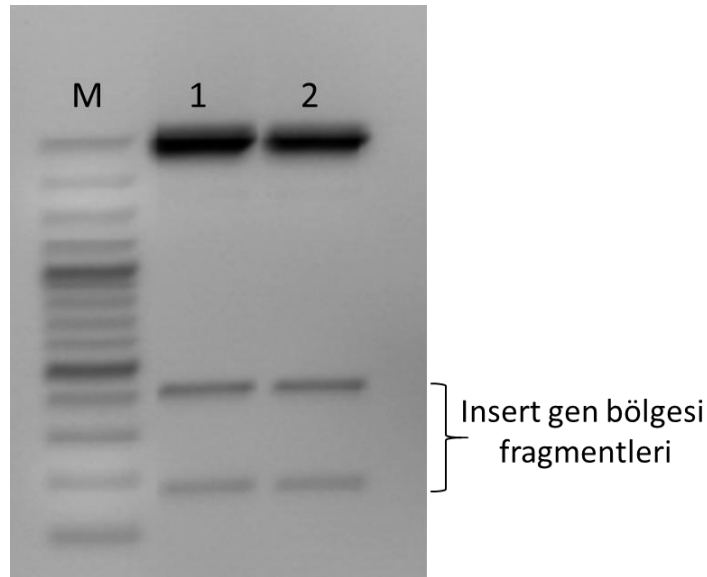
Şekil 4.18 *D. gallinae* gelişim dönemlerinden oluşturulmuş genomik DNA havuzlarında *Salmonella* spp. 16S rRNA gen bölgesini amplifiye eden 16SF ve 16SR primerleri ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker; 1-5: Ergin havuzlar, 6-8: Nimf havuzları, 9: Larva havuzu, P: *Salmonella* referans DNA

Salmonella spp. pozitif belirlenen ve ergin dönemlerden teşekkül ettirilmiş genomik DNA havuzlarına ait iki izolatin 16S rRNA amplikonları *Salmonella* tür ve genotipinin belirlenmesi amacıyla diğer gen bölgelerinde olduğu gibi jel pürifiye edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Sekans analizleri için seçilen *Salmonella* spp. izolatlarının 16S rRNA gen bölgesi ampikonlarının jel pürifikasyonu sonrası agaroz jelde görünüşleri. M: Marker; 1-2: İzolatlar

Jel pürifiye edilen ampikonların klonlanması sonucu diğer gen bölgelerinde olduğu gibi bölünmüş kolonilerden seçilen tek koloniler vektör spesifik primerlerle PCR analizlerine tabii tutulmuş ve hedef gen bölgelerinin vektör DNA'sına insert olduğu koloniler belirlenerek sıvı besi yerine aktarılmış ve sonrasında plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmidlerde hedef insert genlerin konfirmasyonu Aval ve XbaI (Thermo Scientific) enzimleriyle restriksiyon analizleri (Şekil 4.20) sonucu sağlanmıştır.



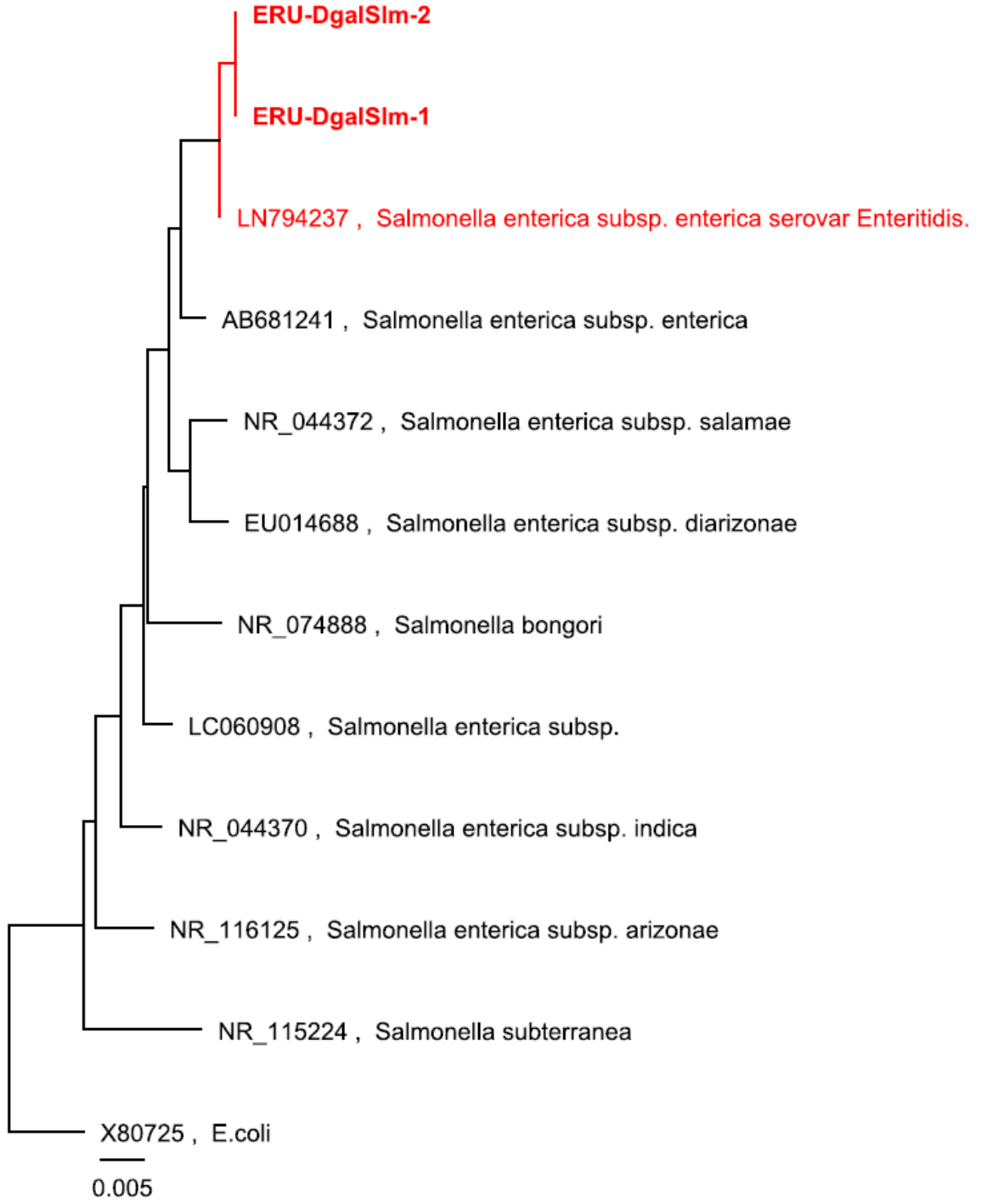
Şekil 4.20 Saflaştırılan plazmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu insert 16S rRNA gen bölgesi fragmentlerinin agaroz jelde görünümü. M: Marker (100bp); 1-2: Insert 16S rRNA gen bölgesi

16S rRNA gen bölgesi yönünden sekans analizleriyle karakterize edilen *Salmonella* spp. izolatları, tür/alt tür, izole edildiği *D. gallinae* gelişim dönemi ve GenBank aksesyon numaralarıyla birlikte Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.9 16S rRNA gen bölgesine göre karakterize edilen *Salmonella* izolatlarının tür, DNA izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları

İzolat	Tür/Alt tür	DNA izolasyon kaynağı (<i>D. gallinae</i>)	GenBank Aksesyon
ERU-DgalSIm-1	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i>	Ergin	KU866533
ERU-DgalSIm-2	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i>	Ergin	KU866534

ERU-DgalSIm-1 ve ERU-DgalSIm-2 izolatlarına ait 16S rRNA sekanslarının birbirleri ve blastn analizlerinde referans *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* izolatıyla (GenBank aksesyon: LN794237) %100 identik olduğu saptanmıştır. İlgili izolatların diğer *Salmonella* tür/alt türlerine ait izolatlarla birlikte General Time Reversible (GTR) + G modeli kullanılarak neighbour joining analiziyle filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21 Çalışmada belirlenen izolatların (kırmızı ve kalın karakter) diğer *Salmonella* tür/alt türlerine ait izolatlarla birlikte filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri. Neighbour joining analizinde General Time Reversible (GTR) + G modeli kullanılmıştır. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kırmızı tavuk biti olarak da nitelenen *D.gallinae* Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa, ve Japonya ve Çin gibi Uzak Doğu ülkelerini de kapsamak üzere Dünyanın birçok bölgesinde yumurtacı tavuklar için önemli bir tehdit oluşturmaktadır (4, 24-26). *D. gallinae* enfestasyonlarına bağlı kontrol ve üretim kayıpları temelinde Avrupa Birliği ülkelerinde yumurta sektöründe yıllık ekonomik kayıpların 130 milyon euro civarında olduğu tahmin edilmekte olup diğer birçok bölgede de benzer veya daha yüksek kayıplar ifade edilmektedir (25). *D. gallinae* üzerine her açıdan araştırmaların son yıllarda artış gösterdiği (68) görülmesine karşın Türkiye’de bu akar, yol açtığı hastalıklar ve ekonomik kayıplar üzerine epidemiyolojik anlamda geniş çaplı araştırmalar bulunmamaktadır. Bununla birlikte sınırlı sayıdaki prevalans, olgu sunumu ve doğal enfeksiyonlarda klinik biyokimyasal çalışmalarda Türkiye’de *D. gallinae* üzerine bazı veriler sağlanmıştır. Bu çalışmalardan; Aldemir (35), Kars ilinde tavuklarda bulunan ektoparazitlerin yaygınlığının araştırılması amacıyla gerçekleştirdiği araştırmada 264 tavuk örneğinde *D. gallinae* yaygınlığını %6,06 belirlemiştir. Bursa’da köy tavuklarında yapılan bir araştırmada (36); 628 tavuğun %4,0’ünde *D. gallinae* enfestasyonu saptanmıştır. Konya’da yapılan bir çalışmada (37) doğal *D. gallinae* enfestasyonunun horozların bazı hematolojik parametrelerinde ve canlı ağırlıklarında bir değişiklik oluşturup oluşturmayacağı araştırılmış ve *D. gallinae*’nin horozlarda alyuvar sayısı, hemoglobin miktarı ve hematokrit değerinde azalmaya yol açması nedeniyle belirgin bir anemiye sebep olduğu, alyuvar tiplerinden heterofil oranında artışa, lenfosit oranında ise azalmaya neden olarak immun sistemi etkilediği, heterofil/lenfosit oranında artışa yol açarak kanatlıları yoğun bir stres altına soktuğu ve canlı ağırlık kaybına yol açtığı kaydedilmiştir. Diğer bir çalışmada (3) doğada tesadüfen bulunarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıklar Anabilim Dalına getirilen bir kırlangıç yavrusunda *D. gallinae* ile enfestasyon teşhisi konulmuş olup bu çalışma sonucunda yabani kanatlıların *D. gallinae* enfestasyonları için evcil kanatlılara risk oluşturduğu vurgulanmıştır. Yine Tiğin

(33) ve Gıcık(34), evcil ve yabani güvercinlerde yaptıkları araştırmalarda %8,61 ve %0,5 oranında enfestasyon rapor etmişlerdir. Çalışmamızda Kayseri’de bir yumurta tavukçuluğu işletmesinden Anabilim Dalımıza intikal ettirilmiş olan 8 adet ölü tavuğun hepsinin üzerinde yoğun *D. gallinae* akarlarına rastlanmış ve tavukların üzerinden 1920 adet ergin (%69,8), 785 adet nimf (%28,6) ve 45 adet larva (%1,6) olmak üzere toplam 2750 adet akar örneği izole edilmiştir. Enfeste tavuk örneği başına düşen ergin, nimf ve larva bazında ortalama akar sayısı da sırasıyla 240, 98,1 ve 5,6 belirlenmiştir. Kafeste yetiştirilen yumurta tavuklarında kanatlı başına genellikle 50.000 civarında akarın enfestasyona yol açtığı ancak ağır olgularda bu sayının 500.000 akara kadar yükseldiği kaydedilmiştir (103). Çalışmamızda belirlenen kanatlı başına akar sayılarını bu oranlardan daha düşük olduğu görülmekte olup, bu durumun işletme yapısı, ilgili ekosistemdeki akar popülasyonu ile enfeste tavuk örneklerinin ölümünden Anabilim Dalı Laboratuvarına nakline kadar geçen süreyle de ilişkili olabileceği düşünülmüştür. *D. gallinae*’nin yumurtadan ergin dönemine kadar gelişiminde bir larva ve iki nimf dönemi bulunmakta olup, genellikle gelişim iki haftanın üzerinde tamamlanmaktadır. Ancak optimum koşullarda bu süre yarıya kadar düşebilir (104). Ortam sıcaklığının 10°C-35°C arasında ve yüksek nisbi nemin (>%70) bulunduğu kanatlı işletmeleri *D. gallinae* popülasyonlarının üremesi ve gelişimi için oldukça uygun olduğu bilinmektedir (104, 105). Bu nedenle yumurtacı işletmelerde akar popülasyonların haftalık iki katına kadar çıkabildiği rapor edilmiştir (31, 104). *D. gallinae* tüm yıl boyu görülebilmese karşın, en yüksek yoğunlukların sıcak ve nemli sezonlarda özellikle de yaz aylarında gözlemlendiği kaydedilmiştir (21, 106). Bu çalışmada araştırma materyalini oluşturan tavukların, ilgili yumurta tavukçuluğu işletmesinden şikayetle Anabilim Dalı’na intikal ettiği dönem de yukarıdaki bildirimlere (21, 104, 106) paralel olarak bu akarlar için optimum koşulları sağlayabilecek Temmuz ayına tekabül etmiştir. Ayrıca kümeslerde altık temizliğinin de *D. gallinae* enfestasyonlarının yoğunluğuna direkt etki ettiği ve rutin temizlik yapılan işletmelerde enfestasyon yoğunluğunun çok daha az olduğu rapor edilmiştir (106). Bununla birlikte yumurtacı tavuk işletmelerinde kanatlı değişiminin (turnover) genellikle bir yılı aştığı göz önüne alındığında bu periyod içerisinde *D. gallinae* popülasyonlarının çoğalabilmesi için birçok faktör uygun hale gelebilmektedir (68). Nitekim *D. gallinae* yeni sürüleri enfeste edebilmek için 8 aya kadar beslenmeden de uzun bir süre canlılığını koruyabilmektedir (4, 32). Çeşitli araştırmacıların (68, 106) da rapor ettiği gibi bu çalışmada da ilgili işletmede yoğun enfestasyon görülmesi,

yetiştiricilerin konu ile ilgili düşük bilgi ve yetersiz deneyimde olmaları, yetersiz bakım koşulları ve yetersiz işletme uygulamaları ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Yine kanatlı işletmelerindeki temizliğin yeterli sıklıkta yapılmaması, dışkı atıklarının çiftliğe yakın olarak konumlandırılması ve önceden kullanılmış yumurta toplama tablalarının yeterince temizlenmeden tekrar kullanılması gibi faktörlerin de re-enfestasyonların ortaya çıkmasında önemli faktörler olduğu belirtilmiştir (106).

Birçok biyoorganizmada olduğu gibi moleküler tekniklerin gelişimi akaroloji sistematğinde de köklü değişimlere yol açmıştır (107, 108). Özellikle barkodlama yaklaşımları gibi moleküler identifikasyon tekniklerinin akar çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaya başlandığı görülmektedir (107, 109-111). DNA barkodlama tür düzeyinde bilgi sağlayan DNA bölgelerinin amplifikasyonu ve sekanslanması temeline dayanmaktadır. Birçok hayvan grubu için mt-COI gen bölgesinin parsiyel 648 bp kısmının oldukça kullanışlı bir barkodlama bölgesi olduğu ortaya çıkarılmıştır (112-114). İlgili gen bölgesi ayrıca kompleks organizmaların çözümlenmesinde ve kriptik türlerin ortaya çıkarılmasında da oldukça etkili olduğu rapor edilmiştir (115). Farklı ülkelerden *D. gallinae* popülasyonlarından izole edilmiş çeşitli haplotiplerin mt-COI barkodlamasıyla karakterizasyonları sağlanmış ve filogenetik ilişkileri araştırılmıştır (29, 93, 94, 116). Marangi ve ark., (116); İngiltere, Fransa ve İtalya’da çeşitli kanatlı çiftliklerinden izole ettikleri *D. gallinae* izolatlarının mt-COI sekans ve filogenetik analizleri sonucu genetik varyasyonun %34,8 olmak üzere en yüksek İngiltere orjinli izolatlarda belirlediklerini, bunu Fransa izolatlarının takip ettiğini, İtalya izolatlarında ise varyasyonun çok düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar (116), ayrıca bazı İngiltere ve Fransa izolatlarının genetik olarak birbirine yakın bulunduğunu ve mt-COI filogenisinde aynı clade’de kümelenediklerini rapor etmişler ve ülkeler arası popülasyonların geçişine dikkat çekmişlerdir. Oines ve Brannstrom(29), İsveç ve Norveç’in çeşitli bölgelerinden izole ettikleri *D. gallinae* izolatlarıyla birlikte GenBankta mevcut Hollanda, Belçika, Fransa ve Polonya’dan izolatlara ait mt-COI gen bölgelerinin analizi sonucu 47 haplotipin varlığını ve bunların dört ana haplogrupta toplandığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar (29) bu haplotiplerin 29’unun İsveç, Norveç, Finlandiya, İskoçya, Hollanda ve Fransa orijinli olduğunu ve Haplogrup A’da yer aldığını, 13’ünün İsveç, Norveç, İskoçya, Hollanda, Polonya, Danimarka ve Fransa orijinli olduğunu ve Haplogrup B’de kümelandığını, Haplogrup C’de 4, Haplogrup D’de ise bir

haplotipin bulunduğunu ve hepsinin Fransa orjinli olduğunu kaydetmişlerdir. Marangi ve ark., (93), İtalya'nın güney ve kuzey bölgelerinden izole ettikleri *D. gallinae* popülasyonlarında mt-COI gen bölgesi sekans ve filogenetik analizleriyle genetik heterojenitenin düşük olduğunu bildirmişler ve saptanan haplotiplerin iki ana haplogrupta yerleşim gösterdiğini ve her iki haplogrubun da diğer bazı Avrupa ülkelerinden (İsveç, Norveç, Fransa, Hollanda, Finlandiya, İskoçya, Polonya ve Belçika) kayıtlı haplotiplere daha uzak olduğunu tespit etmişlerdir. Chu ve ark.,(94), Japonya'nın farklı bölgelerinden izole ettikleri *D. gallinae* popülasyonlarının mt-COI gen bölgesi sekans analizleri sonucu 28 haplotipin varlığını belirtmişler, ve bu haplotiplerin Avrupa'dan bildirilen haplotiplerle beraber filogenetik analizi sonucu iki ana haplogrupta (A ve B) yer aldığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar (94) belirledikleri haplotiplerin ilgili haplogruplar içerisinde alt-haplogruba (AJ1 ve AJ2; BJ1 ve BJ2) ayrıldığını tespit etmişler, AJ2 ve BJ1 alt-haplogruplarındaki izolatların Avrupa'dan bildirilmiş izolatlarla yakın ilişkili olduğunu buna karşın AJ1 ve BJ2 alt-haplogruplarındaki nesillerin ise genetik olarak ilgili izolatlardan daha uzak ve farklı olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar (94) bu sonuçlarla özellikle AJ2 alt haplogruplarında yer alan ve Avrupa'dan rapor edilen haplotiplerle genetik olarak yakın belirlenen nesillerin sınırlı bir yayılım göstermesini, bu nesillerin Japonya'ya yakın zamanda geçmiş olabileceği şeklinde yorumlamışlar ve bu noktada primer nakil olasılıklarının enfeste tavuk ve/veya yumurta flokları gibi ilgili materyallerin nakliyle ilişkili olabileceğinin altını çizmişlerdir. Buna karşın araştırmacılar (94) yörede yaygın bulunan ve genetik olarak farklı belirlenen AJ1 alt-haplogrubunun ise yöreye özgü nesiller olabileceğini vurgulamışlar yine genetik olarak farklı belirlenen BJ2 alt-haplogrubunun ise sınırlı yayılışa sahip olmasıyla yöreye özgü olamayacağını ve yakın zamanda henüz genetik anlamda verileri bulunmayan başka bir coğrafyadan geçmiş olma ihtimalinin yüksek olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızda mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle karakterize edilen ve barkodlanan *D. gallinae* izolatlarının hepsinin yeni bir haplotip olduğu belirlenmiş ve aralarındaki ortalama genetik diversitenin $10,2 \pm 0,2$ belirlenmiştir. Saptanan bu oranın özellikle İngiltere ve Fransa'dan izole edilmiş popülasyonlardaki genetik diversite oranından (116) daha düşük olduğu dikkati çekmiştir. Çalışmada karakterize edilen toplam 6 haplotipten 5'inin İtalya'dan bildirilen ve E ve F haplogruplarında yer alan (Şekil 4.11) nesillerle genetik olarak yakın oldukları saptanmıştır. Bununla birlikte E haplogrubunda belirlenen ve analiz edilen 6 izolattan 4'ünü oluşturan ERU-Dgal-1, ERU-Dgal-2, ERU-Dgal-3 ve ERU-Dgal-6 haplotiplerinin

aynı haplogrupta yer alan İtalya TE1 izolatından ortalama %11,3 genetik farklılık göstermeleri bu nesillerin yöreye özgü olabileceklerini düşündürmüştür. F haplogrubunda yer alan ERU-Dgal-4 haplotipi ise ilgili İtalya izolatlarıyla birlikte kümelenme göstermiş ve bu izolatlarla yüksek identik (%99,6) bulunmuştur. ERU-Dgal-5 haplotipi ise çalışmada belirlenen diğer haplotiplerden daha farklı bulunmuş ve en geniş filogenetik grubu oluşturan A haplogrubunda yer aldığı saptanmıştır. Bu son iki sonuç yukarıda çeşitli araştırmacıların (29, 93, 94, 116)da belirttiği gibi genetik olarak farklı *D. gallinae* popülasyonlarının ülkeler arası nakil olabilirliği ile ilişkili değerlendirilmiştir. Neticede mt-COI sekans ve filogenetik analiz sonuçları araştırma yöresinde farklı genetik karakterde *D. gallinae* popülasyonlarının varlığını ortaya koymuştur.

Ribozomal DNA (rDNA)'nın birinci (ITS-1) ve ikinci (ITS-2) internal transcribed spacer (ITS) gen bölgeleri göstermiş oldukları yüksek interspesifik ve düşük intraspesifik varyasyonlarla tür sınırlarının belirlenmesi için ve filogenilerin gösterilmesi için uygun genetik markerlardır (117-119). ITS gen bölgeleri kene ve diğer bazı artropoda içerisindeki birbirine yakın türlerin çalışılmasında sıklıkla sekanslanmıştır (117, 119-123). *D. gallinae* ribozomal ITS gen bölgesi sekans ve filogenetik analizi üzerine yapılan çalışmalarda (93, 94) da intraspesifik nükleotid varyasyonlarının %1'e varan ölçüde düşük olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda ITS+ gen bölgesi sekans ve filogenetik analizlerine dahil edilen izolatlarda da yukarıdaki çalışmaların (93, 94) sonuçlarına paralel olarak intraspesifik nükleotid diversitesi oldukça düşük ($0,3 \pm 0,2$) belirlenmiştir. Buna karşın Brännström ve ark. (91), yabani kanatlılar ve yumurtacı tavuk işletmelerinden izole ettikleri *D. gallinae* popülasyonlarına ait nesiller arasında ITS-1 gen bölgesinde yüksek varyasyon belirlemişler ve *D. gallinae*'nin yabani ve evcil olmak üzere iki farklı genotipi olduğunu vurgulamışlardır. Araştırmacılar (91) bu sonuçlarla *D. gallinae*'nin, göçmen kuşlarla ülkeler arası taşınımı olasılığının oldukça düşük olduğunu vurgulamışlar, kanatlı ve ilgili ürünlerin ithalatının ise parazit popülasyonlarının göçünde esas faktör olduğunu kaydetmişlerdir. Çalışmamızda saptanan *D. gallinae* nesillerinin ITS+ gen bölgesi sekans analizi sonuçları temelinde tümünün evcil genotipte olduğu belirlenmiş ve Chu ve ark. (94)'nın belirttiği gibi nükleotid varyasyonlarının biri ITS-1 diğeri de ITS-2 gen bölgesinde olmak üzere iki nükleotid yerleşiminde yer aldığı dikkati çekmiştir. Bu farklılıklar temelinde izolatların birbirine yakın üç filogenetik grupta kümelendiği görülmüştür. Mt-COI gen bölgesine göre karakterize edilen ve farklı

haplogrupta yer alan haplotiplerin ITS+ filogenisinde aynı gruplar içerisinde yerleşim göstermiş olmaları da Chu ve ark. (94)'nın bulgularına paralellik göstermiş ve ilgili gen bölgesinin filogenetik çözünürlüğünün mt-COI gen bölgesine göre oldukça düşük olduğu dikkati çekmiştir. Çalışmada ayrıca bir izolata (7E-ITS) ait ITS+ *D. gallinae*'ye ait olmadığı ve *Pichia* soyundaki mantar izolatlarıyla yüksek identiklik (%94,7) gösterdiği belirlenmiştir. Nitekim ilgili izolat PCR analizlerinde *D. gallinae* izolatlarıyla aynı büyüklükte amplifikasyon göstermiş olmasına karşın plazmidlerinin restrüksiyon analizlerinde farklı büyüklükte DNA fragmenti göstermiştir. Elde edilen bu sonuç ilgili primerlerin optimizasyon ve spesifite kontrollerinin yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

D. gallinae'nin şimdiye kadar 30'un üzerinde kanatlı konakta enfestasyona yol açtığı kaydedilmiş olup evcil tavuk (*Gallus gallus domesticus*) dışında en yaygın konakların evcil ve vahşi güvercinler, yetiştirme çiftliklerindeki kanaryalar ve yumurta tavuğu işletmeleriyle direkt ilişkili bulunan kuşların olduğu belirtilmiştir (124). Bununla birlikte *D. gallinae*'nin insan ve diğer memeli çiftlik hayvanlarını da enfeste etmesi üzerine artan bir şekilde raporların varlığı dikkat çekicidir. *D. gallinae*'nin köpek ve kedileri enfeste ederek kan ile beslenebildiği üzerine çeşitli kaynaklar (125-127) bulunmakla birlikte akarların aynı zamanda atlarda dermatitise yol açtığı da rapor edilmiştir (128). *D. gallinae* ayrıca keçilerde uyuz kontrolü için alınan deri kazıntılarında (129) ve kanatlı kümeslerindeki fareler üzerinden de (130) izole edilmiştir. Ancak bu raporlar ilgili konaklarda *D. gallinae* enfestasyonunu konfirme etmemektedir. Çünkü *D. gallinae* keçi ve fareler üzerinde beslenmeden konaklayabilmektedir (1). Buna karşın laboratuvar koşullarında yürütülen bir çalışmada (1) *D. gallinae*'nin fare ve tavşanlardan beslenebildiği, diğer bir çalışmada (131) ortamda kanatlı olmadığında akarların rodentlerde kalıcı enfestasyon oluşturabildiği belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada (132) *D. gallinae*'nin çeşitli omurgalı türlerine ait kan örneklerinde beslenebilme ve biyolojisini devam ettirebilme yeteneği araştırılmış ve akarların in-vitro ortamda bıldırcın, tavuk, koyun, buzağı, domuz ve tavşan kanıyla beslenebildiği ve sonucunda da gömlek değiştirerek biyolojisine devam edebildiği belirlenmiştir. Ancak aynı çalışmada (132) kan örneklerinin farklı hayvan deri membranlarıyla sunulması sonucunda akarların yalnızca kuş derileri üzerinden elverişli ve etkin bir şekilde beslenebildikleri gözlemlenmiştir. Çalışmamızda ilginç bir şekilde moleküler analizlere dahil edilen bir adet ergin *D. gallinae*

izolatının parsiyel mt-COI sekansı GenBank blastn analizlerinde sığır (*Bos taurus*) mt-COI gen bölgesi sekansları ile yüksek identiklik göstermiş (%99,1) ve ilgili izolat ERU-Dgal-BosTaurus olarak isimlendirilerek (GenBank aksesyon: KU866542) kayıt altına alınmıştır. Nitekim mt-COI gen bölgesi amplifikasyonunda kullanılan COX1F ve COX1R primerlerinin sığır mt-COX1 gen bölgesinin amplifikasyonu açısından uyumluluğu incelendiğinde forward dizilimde 3, reverse dizimde ise 1 baz uyumsuzluğu belirlenmesine karşın optimum annealing ısısında aynı büyüklükte (453 bp) amplifikasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte aynı örneğe ait ITS+ gen bölgesi sekansları ilgili izolatın *D. gallinae* olduğunu konfirme etmiştir. Elde edilen bu sonuç doğal ortamda *D. gallinae*'nin sığırlardan kan beslenmesi yapabilirliği üzerine orijinal bir kanıt ortaya koymuştur. Bunun yanında epidemiyolojik konspette *D. gallinae*'nin konak-parazit ilişkileri üzerine detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu da görülmektedir.

Günümüze kadar *D. gallinae*'nin kanatlı ve diğer memelilerde enfeksiyon oluşturan çeşitli bakteri ve virüsleri mekanik ve/veya biyolojik vektör olarak taşıyabilirliği üzerine sınırlı sayıda deneysel ve saha çalışmaları yürütülmüş ve bu akarın başta *Salmonella* spp. olmak üzere *Pasteurella multocida*, *Chlamydia* spp., *Borrelia anserina*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Coxiella burnetii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Streptomyces* spp., *Spirochetes* gibi bakterilerin yanında, kanatlı leucosisi, yalancı veba, tavuk çiçeği virüsü, kanatlı influenza A, St. Louis ensefaliti, Tick-borne ensefalit, Doğu ve Batı at ensefaliti ve Venezüella at ensefaliti gibi virüsleri nakledebileceği veya ilişkili olduğu üzerine bilimsel veriler sağlanmıştır (2, 68). *Salmonella* spp. enfeksiyonları kanatlı çiftliklerindeki en büyük problemlerden birini oluşturmakta olup en yaygın zoonoz hastalıklardan birisidir. *Salmonella* enfeksiyonları çoğu durumda kanatlılara herhangi bir klinik tablo oluşturmadan subklinik olarak seyir gösterebilir. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis serotipi (*Salmonella Enteritidis*) insanlardaki *Salmonella* enfeksiyonuna neden olan en önemli serotiptir. Bu serotip aynı zamanda birçok kanatlı işletmesinde de problemlere yol açmakta olup çeşitli hijyen yöntemleriyle kontrol edilmeye çalışılmaktadır (73, 74). Fakat bu enterobakterilerin çevreye karşı çok dirençli olduğu belirlenmiş ve özellikle kanatlı dışkısında 2,5 yıla kadar hayatta kalabildiği rapor edilmiştir (75). *D. gallinae*'nin *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Enteritidis'e deneysel olarak biyolojik

vektörlük yaptığı Valiente Moro ve ark. (71) tarafından ortaya konmuştur. Araştırmacılar (71) *D. gallinae* gelişim dönemlerinin bakteriyi enfekte kanatlıdan kan emerken alabileceği gibi daha önemli olmak üzere akarların kanatlı dışkıları ya da kontamine yüzeylere kütiküler temas yoluyla da etkenleri alabildiklerini ve bu transmisyon yolunun kan yoluna oranla daha önemli olduğunu kaydetmişlerdir. Yine araştırmacılar (71) bakterinin vertikal ve nimf dönemleri arasında transstadial naklini ispatlamışlar ve *D. gallinae*'nin biyolojik vektörlüğünü ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar (71) yine bakteri ile enfekte akarların kanatlılara etkeni kan beslenmesi sırasında naklinden ziyade henüz ölmüş veya ezilmiş enfekte akarların ağız yolu ile kanatlılar tarafından alınması yolunun enfeksiyon için çok daha önemli olduğunu vurgulamışlardır. Bununla birlikte araştırmacılar (71) *Salmonella* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde *D. gallinae*'nin uygun vektörlük potansiyelinin varlığını öne sürebilmek için çok daha geniş ve kapsamlı saha çalışmalarına ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır. Diğer yandan Güney Kosova (83), Fransa (72) ve Japonya (133) olmak üzere sınırlı sayıdaki ülkelerde yapılan çalışmalarda çeşitli kanatlı işletmelerinden izole edilen *D. gallinae* popülasyonlarında moleküler olarak *Salmonella enterica* ve/veya *Salmonella* spp. izolasyonu yapılmıştır. Çalışmamızda *D. gallinae* gelişim dönemleri bazında oluşturulmuş toplam 38 genomik DNA havuzunun 9'unda (%23,7) *Salmonella* spp. 16S rRNA gen bölgesini parsiyel olarak amplifiye eden primerlerle PCR analizleri sonucu pozitiflik belirlenmiş olup tüm gelişim dönemlerine ait havuzlarda pozitifliğin olduğu dikkati çekmiştir. Nitekim ilgili kanatlı işletmesinde *Salmonella* probleminin yaşandığı da ikili görüşmelerde teyit edilmiştir.

Larva havuzunda saptamış olan *Salmonella* spp. pozitifliği, vertikal bir nakli düşündürebileceği gibi temas yoluyla oluşmuş bir kontaminasyonla da ilgili olabilir. Nitekim benzer bir sonuç, deneysel bir çalışmada da gösterilmiştir (71). Deneysel çalışmada, Valiente Moro ve ark. (71)'nin belirttiği gibi vertikal ve/veya transstadial nakil sonucu olabileceği gibi akarların enfekte kanatlılardan kan beslenmesi esnasında ya da enfekte dışkı veya yüzeylere temas sonucu da ortaya çıkmış olabilir. Yine çalışmamızda pozitif belirlenen ergin havuzlarına ait iki izolatin (ERU-DgalSIm-1 ve ERU-DgalSIm-2) 16S rRNA sekans ve blastn analizleri sonucu *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis olarak karakterize edilmiş olmaları, ilgili serovaryetenin zoonotik potansiyeli ve Valiente Moro ve ark. (71)'nin *D. gallinae*'nin biyolojik vektörlük potansiyelini ortaya

koymuş olmaları da göz önüne alındığında ilgili ekosistemdeki *D. gallinae* popülasyonlarının *Salmonella* enfeksiyonlarının nakli ve epidemiyolojisi açısından yüksek risk potansiyeline sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile Türkiye’de ilk kez *D. gallinae* popülasyonlarına ait nesillerin filogenetik karakterizasyonu sağlanmıştır. ITS+ filogenetik analiz sonuçlarına göre incelenen *D. gallinae* izolatlarının tamamının evcil genotipte yer aldığı saptanmıştır. Mt-COI filogenetik yapılanmasına göre yöresel haplotiplerin varlığı üzerine veriler sağlanmış olup ayrıca bazı nesillerin çeşitli Avrupa ülkeleri ve Japonya gibi Uzak Doğu ülkelerinden rapor edilmiş haplotiplerle aynı haplogruplar içerisinde yer aldığı belirlenmiştir. Bu son bulgu çeşitli araştırmaların sonuçları ile paralel olarak epidemiyolojik kapsamda *D. gallinae* nesillerinin başta tavuk, yumurta follukları ve/veya kafesleri gibi ilgili maddelerin ithalat ve ihracatı gibi çeşitli faktörlerle farklı coğrafyalar arasında göç geçirdiğini göstermektedir. Bu çalışma ayrıca *D. gallinae* nesillerinin doğal ortamda sığırlardan kan beslenmesi yapabildiğini de orijinal bir bulgu olarak ortaya koymuştur. Diğer yandan araştırma sonuçları *D. gallinae* popülasyonuna ait incelenen nesillerin, zoonotik karakterli *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis’in kanatlı işletmeleri ve yakın ekosistemde bulaşma dinamikleri açısından yüksek risk potansiyeline sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu açıdan özellikle yumurta tavuğu işletmelerinde sıkça görülen *Salmonella* enfeksiyonları başta olmak üzere diğer çeşitli bakteri ve virüs enfeksiyonlarının bulaşma dinamikleri arasında *D. gallinae* mutlaka göz önüne alınmalı ve söz konusu patojenlerle mücadelenin yanısıra bu akarlar karşı da etkin kontrol ve mücadele stratejileri geliştirilmelidir. Bu çalışma Türkiye’de *D. gallinae* vektör potansiyelleri üzerine ilk moleküler epidemiyolojik verileri sağlamıştır. Ancak Türkiye’de yaygınlık gösteren *D. gallinae* popülasyonları ve çeşitli enfeksiyon ajanlarının nakli açısından oluşturdukları risk potansiyelleri üzerine daha kapsamlı moleküler epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. George DR, Finn RD, Graham KM, et al. Should the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* be of wider concern for veterinary and medical science? Parasit Vectors 2015; 8: 178.
2. Sommer D, Heffels-Redmann U, Kohler K, et al. Role of the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) in the transmission of avian influenza A virus. Tierarztl Prax Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere 2016; 44: 26-33.
3. Kurtdede A, Ural K, Aktaş MS ve ark. A case of *Dermanyssus gallinae* in a swallow and its therapy with cypermethrin. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2005; 11: 175-177.
4. Chauve C. The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. Vet Parasitol 1998; 79: 239-245.
5. Soulsby EJJ. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, England: Bailliere Tindall, 1986.
6. Karaer Z, Nalbantoğlu S, Uslu U. Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları, İzmir, 2013: 638-641.
7. Roy L, Chauve CM. Historical review of the genus *Dermanyssus* Duges, 1834 (Acari: Mesostigmata: Dermanyssidae). Parasite 2007;14:87-100.
8. Moss WW. The mite genus *Dermanyssus*: a survey, with description of *Dermanyssus trochilinis*, n. sp., and a revised key to the species (Acari: Mesostigmata: Dermanyssidae). J Med Entomol 1978; 14 :627-640.
9. Dik B. Veteriner Entomoloji, Konya, Vet. Fak. Yayınları, 2003: 227-229.
10. Akdemir C, Gulcan E, Tanritanir P. Case report: *Dermanyssus gallinae* in a patient with pruritus and skin lesions. Türkiye Parazitol Derg 2009; 33: 242-244.
11. Meyer-Kuhling B, Pfister K, Muller-Lindloff J, et al. Field efficacy of phoxim 50% (ByeMite) against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* in battery cages stocked with laying hens. Vet. Parasitol 2007; 147: 289-296.
12. Pritchard J, Kuster T, Sparagano O, et al. Understanding the biology and control of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*: a review. Avian pathology : journal of the WVPA 2015; 44: 143-153.
13. Di Palma A, Giangaspero A, Cafiero MA, et al. A gallery of the key characters to ease identification of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Gamasida: Dermanyssidae) and allow differentiation from *Ornithonyssus sylviarum* (Acari: Gamasida: Macronyssidae). Parasit Vectors 2012; 5: 104.

14. Moss WW. An illustrated key to the species of the acarine genus *Dermanyssus* (Mesostigmata: Laelapoidea: Dermanyssidae). J Med Entomol 1968; 5: 67-84.
15. Hoffmann G. Vogelmilbe als Lästlinge, Krankheiten erzeuger und Vektoren bei Mensch und Nutztier. Dr Tierärztl Wschr 1987; 95: 7-10.
16. Schneider J, Haaß K. Untersuchungen zur Schadwirkung der roten Vogelmilbe (*Dermanyssus Avium*) in Intensivhühnerbeständen. Berl Münch tierärztl Wschr 1971; 84: 130-132.
17. Kirkwood AC. Anaemia in poultry infested with the red mite *Dermanyssus gallinae*. Vet rec 1967; 80: 514-516.
18. Auger P, Nantel J, Meunier N, et al. Skin acariasis caused by *Dermanyssus gallinae* (de Geer): an in-hospital outbreak. CMAJ 1979; 120: 700-703.
19. Beck W. Farm animals as disease vectors of parasitic epizoonoses and zoophilic dermatophytes and their importance in dermatology. Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete 1999; 50:621-628.
20. Cencek T. Prevalence of *Dermanyssus gallinae* in poultry farms in Silesia Region in Poland. Vet Inst Pulawy 2003; 47: 465-469.
21. Nordenfors H, Hoglund J. Long term dynamics of *dermanyssus gallinae* in relation to mite control measures in aviary systems for layers. Br Poult Sci 2000; 41: 533-540.
22. Chirico J, Tauson R. Traps containing acaricides for the control of *Dermanyssus gallinae*. Vet. Parasitol 2002; 110: 109-116.
23. Nordenfors H, Hoglund J, Tauson R, et al. Effect of permethrin impregnated plastic strips on *Dermanyssus gallinae* in loose-housing systems for laying hens. Vet. Parasitol 2001; 102: 121-131.
24. Mullen G, O'Connor B. Mites (Acari). In Medical and Veterinary Entomology. Mullen GR LD, San Diego, 2009.
25. Sparagano O, Pavlicevic A, Murano T, et al. Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infections in poultry farm systems. Exp Appl Acarol 2009; 48: 3-10.
26. Wang FF, Wang M, Xu FR, et al. Survey of prevalence and control of ectoparasites in caged poultry in China. Vet Rec 2010; 167: 934-937.
27. Fiddes MD, Le Gresley S, Parsons DG, et al. Prevalence of the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) in England. Vet Rec 2005; 157: 233-235.
28. Guy JH, Khajavi M, Hlalel MM, et al. Red mite (*Dermanyssus gallinae*) prevalence in laying units in Northern England. British poultry science 2004; 45: 15-16.
29. Oines O, Brannstrom S. Molecular investigations of cytochrome c oxidase subunit I (COI) and the internal transcribed spacer (ITS) in the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, in northern Europe and implications for its transmission between laying poultry farms. Med Vet Entomol 2011; 25: 402-412.
30. Roy L, Buronfosse T. Using mitochondrial and nuclear sequence data for disentangling population structure in complex pest species: a case study with *Dermanyssus gallinae*. PloS one 2011; 6: 22305.

31. Hoglund J, Nordenfors H, Uggla A. Prevalence of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, in different types of production systems for egg layers in Sweden. Poult Sci 1995; 74: 1793-1798.
32. Axtell RC. Poultry integrated pest management: status and future. Integrated Pest Manag Rev 1999; 4: 53-73.
33. Tigin Y. Ectoparasites of domestic pigeons (*Columba livia*). Ankara Üniv Vet Fak Derg 1973; 20: 372-390.
34. Gıcık Y. Ankara ve çevresinde yaban güvercinlerdektoparazitler. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 1999; 5: 71-74.
35. Aldemir O. Kars İlinde Tavuklarda Bulunan Ektoparazitler. T Parazitol Derg 2004; 28: 154-157.
36. Okursoy S. Prevalence of *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) and *Knemidokoptes mutans* (Robin, 1860) in chickens in the province of Bursa. T Parazitol Derg 2001; 25: 75-77.
37. Keçeci T, Handemir E, Orhan G. *Dermanyssus gallinae* İnfestasyonunun Horozların Bazı Hematolojik Değerleri ve Canlı Ağırlıkları Üzerine Etkisi. T Parazitol Derg 2004; 28: 192-196.
38. Calnek B. Diseases of Poultry. Iowa State Univ Press 1997: 800-8001.
39. Özcel M, Üstün Ş. Allerji ve Dermatit Nedeni Olabilen Akarlar, Tıbbi Parazit Hastalıkları. Özcel PDMA, İzmir, Türkiye Parazitol Derg, 2007.
40. Wall R, Shearer D. Veterinary Entomology, Hall Ca, London, 1997.
41. AA W. In a manual of acarology. Krantz G, Walter D, Texas Tech Univ Press, 2009.
42. Ash LS, Oliver JH, Jr. Susceptibility of *Ornithodoros parkeri* (Cooley) (Acari: Argasidae) and *Dermanyssus gallinae* (DeGeer) (Acari: Dermanyssidae) to ivermectin. J Med Entomol 1989; 26: 133-139.
43. Zeman P. Systemic efficacy of ivermectin against *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) in fowls. Vet. Parasitol 1987; 23: 141-146.
44. Reynaud MC, Chauve CM, Beugnet F. *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): experimental life cycle and test of the acaricidal action of moxidectin and ivermectin. Recl Med Vet 1997; 148: 433-438.
45. Dik B, Güçlü F, editors. Tavukların Paraziter Hastalıkları, Tavuk Yetiştiriciliği ve Hastalıkları. VI. Hayvancılık ve Beslenme Sempozyumu, 1995, Konya.
46. Kaya S. Kematerapötikler, Vetriner Farmakoloji ve İlaçla Sağaltım Seçenekleri. Kaya S, Şanlı Y, editors. Ankara: Medisan Yayınevi 1994.
47. Thind BB, Ford HL. Assessment of susceptibility of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae) to some acaricides using an adapted filter paper based bioassay. Vet. Parasitol 2007; 144: 344-348.
48. Shane S. Poultry Diseases. American Soybean Association, Singapore, 2005.
49. Inashvili Z. Efficacy of sevin (carbaryl) and dicresyl in the form of dust aerosols against *Dermanyssus gallinae* Veterinaria. Moscow 1985: 25-26.

50. Beugnet F, Chauve C, Gauthey M, et al. Resistance of the red poultry mite to pyrethroids in France. *Vet rec* 1997; 140: 577-579.
51. Genchi C, Huber H, Traldi G. The efficacy of flumethrin (Bayticol Bayer) for the control of chickenmite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) (Acarina, Dermanyssidae). *Arch Vet* 1984; 35: 125±128.
52. Zeman P. Encounter the poultry red mite resistance to acaricides in Czechoslovak poultry-farming. *Folia Parasitol* 1987; 34: 369-373.
53. Zeman P, Zelezny J. The susceptibility of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778), to some acaricides under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol* 1985; 1: 17-22.
54. Fletcher MG, Axtell RC. Susceptibilities of northern fowl mite, *Ornithonyssus sylviarum* (Acarina: Macronyssidae), and chicken mite, *Dermanyssus gallinae* (Acarina: Dermanyssidae), to selected acaricides. *Exp Appl Acarol* 1991; 13: 137-142.
55. McDevitt R, Nisbet AJ, Huntley JF. Ability of a proteinase inhibitor mixture to kill poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* in an in vitro feeding system. *Vet. Parasitol* 2006; 141: 380-385.
56. Willadsen P. Anti-tick vaccines. *Parasitology* 2004; 129: 367-387.
57. Harrington D, Din HM, Guy J, et al. Characterization of the immune response of domestic fowl following immunization with proteins extracted from *Dermanyssus gallinae*. *Vet. Parasitol* 2009; 160: 285-294.
58. DeVaney JA, Ziprin RL. Acquired immune response of White Leghorn hens to populations of northern fowl mite, *Ornithonyssus sylviarum* (Canestrini and Fanzago). *Poult sci* 1980; 59: 1742-1744.
59. Kirkwood A. Longevity of the Mites *Dermanyssus Gallinae* and *Liponyssus Sylviarum*. *Exp Parasitol* 1963; 14: 358-366.
60. Lee S, Kim J, Jee C. Immune effects on the somatic antigens against *Dermanyssus gallinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in chicken. *Korean J Vet Res* 2002; 42: 253-260.
61. Wright H, Bartley K, Nisbet A, et al. The testing of antibodies raised against poultry red mite antigens in an in vitro feeding assay: preliminary screen for vaccine candidates. *Appl Acarol* 2009; 48: 81-91.
62. Arkle S, Harrington D, De Luna C, et al. Immunological control of poultry red mite: the use of whole mite antigens as a candidate vaccine. *Ann NY Acad* 2009; 1149: 36-40.
63. Arkle S, George DR, Guy JH, et al. Comparison of in vivo and in vitro survival and fecundity rates of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Res Vet Sci* 2010; 88: 279-280.
64. Harrington DW, Guy JH, Robinson K, et al. Comparison of synthetic membranes in the development of an in vitro feeding system for *Dermanyssus gallinae*. *Bull Entomol Res* 2010; 100: 127-132.

65. Harrington D, Canales M, de la Fuente J, et al. Immunisation with recombinant proteins subolesin and Bm86 for the control of *Dermanyssus gallinae* in poultry. *Vaccine* 2009; 27: 4056-4063.
66. Bartley K, Nisbet AJ, Offer JE, et al. Histamine release factor from *Dermanyssus gallinae* (De Geer): characterization and in vitro assessment as a protective antigen. *Int J Parasitol* 2009; 39: 447-456.
67. Bartley K, Huntley JF, Wright HW, et al. Assessment of cathepsin D and L-like proteinases of poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (De Geer), as potential vaccine antigens. *Parasitology* 2012; 139: 755-765.
68. Sparagano OA, George DR, Harrington DW, et al. Significance and control of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Annu Rev Entomol* 2014; 59: 447-466.
69. Nordenfors H, Höglund J, Uggla A. Control of the red poultry mite *Dermanyssus gallinae*. *Svensk Veterinärtidning* 1996; 48: 161-167.
70. Valiente Moro C, Chauve C, Zenner L. Vectorial role of some dermanyssoid mites (Acari, Mesostigmata, Dermanyssoidea). *Parasite* 2005; 12: 99-109.
71. Valiente Moro C, Chauve C, Zenner L. Experimental infection of *Salmonella enteritidis* by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. 2007; 146: 329-336.
72. Valiente Moro C, Thioulouse J, Chauve C, et al. Bacterial taxa associated with the hematophagous mite *Dermanyssus gallinae* detected by 16S rRNA PCR amplification and TTGE fingerprinting. *Res Microbiol* 2009; 160: 63-70.
73. Lacey RW. Food-borne bacterial infections. *Parasitology*. 1993;107 Suppl:S75-93.
74. Rodrigue DC, Tauxe RV, Rowe B. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? *Epidemiol Infect.* 1990; 105: 21-27.
75. Morse EV, Duncan MA. *Salmonellosis*--an environmental health problem. *J Am Vet Med Assoc* 1974; 165: 1015-1019.
76. Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, et al. Nymphs of the Oriental cockroach (*Blatta orientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. *Med Vet Entomol* 2003; 17: 145-150.
77. Olsen AR, Hammack TS. Isolation of *Salmonella* spp. from the housefly, *Musca domestica* L., and the dump fly, *Hydrotaea aenescens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae), at caged-layer houses. *J Food Prot* 2000; 63: 958-960.
78. Skov MN, Spencer AG, Hald B, et al. The role of litter beetles as potential reservoir for *Salmonella enterica* and thermophilic *Campylobacter* spp. between broiler flocks. *Avian dis* 2004; 48: 9-18.
79. Zeman P, Stika V, Skalka B, et al. Potential role of *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778 in the circulation of the agent of pullurosis-typhus in hens. *Folia parasitol* 1982; 29: 371-374.
80. Nakajima Y, Ishibashi J, Yukuhiro F, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1624: 125-130.

81. Weyer F. Observations on the behaviour of *Coxiella burnetii*, the causal agent of Q fever, in the Argasid tick *Ornithodoros moubata*. Theor Chim Acta 1975; 26: 219-231.
82. Nordenfors H, Chirico J. Evaluation of a sampling trap for *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). J Econ Entomol 2001; 94: 1617-1621.
83. Hamidi A, Sherifi K, Muji S, et al. *Dermanyssus gallinae* in layer farms in Kosovo: a high risk for *Salmonella* prevalence. Parasit Vectors 2011; 4: 136.
84. Dergousoff SJ, Chilton NB. Differentiation of three species of ixodid tick, *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis* and *D. albipictus*, by PCR-based approaches using markers in ribosomal DNA. Mol Cell Probes 2007; 21: 343-348.
85. Hinomoto N, Dinh Pha T, Anh Tuan P, et al. Identification of spider mites (Acari: Tetranychidae) by DNA sequences: a case study in northern Vietnam. Int J Acarol 2007; 33: 53-60.
86. Toda S, Osakabe M, Komazaki S. Interspecific diversity of mitochondrial COI sequences in Japanese Panonychus species (Acari: Tetranychidae). Exp Appl Acarol 2000; 24: 821-829.
87. Berrilli F, D'Amelio S, Rossi L. Ribosomal and mitochondrial DNA sequence variation in Sarcoptes mites from different hosts and geographical regions. Parasit res 2002; 88: 772-777.
88. Webster LM, Thomas RH, McCormack GP. Molecular systematics of *Acarus siro* s. lat., a complex of stored food pests. Mol Phylogenet Evol 2004; 32: 817-822.
89. Wesson DM, McLain DK, Oliver JH, et al. Investigation of the validity of species status of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) using rDNA. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 10221-10225.
90. Navia D, de Moraes GJ, Roderick G, et al. The invasive coconut mite *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae): origin and invasion sources inferred from mitochondrial (16S) and nuclear (ITS) sequences. Bull Entomol Res 2005; 95: 505-516.
91. Brannstrom S, Morrison DA, Mattsson JG, et al. Genetic differences in internal transcribed spacer 1 between *Dermanyssus gallinae* from wild birds and domestic chickens. Med Vet Entomol 2008; 22: 152-155.
92. Potenza L, Cafiero MA, Camarda A, et al. Characterization of *Dermanyssus gallinae* (Acarina: Dermanyssidae) by sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacer regions. Vet Res Commun 2009; 33: 611-618.
93. Marangi M, Cantacessi C, Sparagano OA, et al. Molecular characterization and phylogenetic inferences of *Dermanyssus gallinae* isolates in Italy within an European framework. Med Vet Entomol 2014; 28: 447-452.
94. Chu TT, Murano T, Uno Y, et al. Molecular epidemiological characterization of poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, in Japan. J Vet Med Sci 2015; 77: 1397-1403.
95. Ros VI, Breeuwer JA. Spider mite (Acari: Tetranychidae) mitochondrial COI phylogeny reviewed: host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding. Exp Appl Acarol 2007; 42: 239-262.

96. Navajas M, Lagnel J, Fauvel G, et al. Sequence variation of ribosomal internal transcribed spacers (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. *Exp Appl Acarol* 1999; 23: 851-859.
97. Ziemer CJ, Steadham SR. Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. *Lett Appl Microbiol* 2003; 37: 463-469.
98. Lin CK, Tsen HY. Use of two 16S DNA targeted oligonucleotides as PCR primers for the specific detection of *Salmonella* in foods. *J Appl Bacteriol* 1996; 80: 659-666.
99. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012; 28: 1647-1649.
100. Stecher G, Liu L, Sanderford M, et al. MEGA-MD: molecular evolutionary genetics analysis software with mutational diagnosis of amino acid variation. *Bioinformatics* 2014; 30: 1305-1307.
101. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* 2012; 9: 772.
102. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 2001; 17: 754-755.
103. Kilpinen O, Roepstorff A, Permin A, et al. Influence of *Dermanyssus gallinae* and *Ascaridia galli* infections on behaviour and health of laying hens (*Gallus gallus domesticus*). *Br Poult Sci* 2005; 46: 26-34.
104. Maurer V, Baumgartner J. Temperature influence on life table statistics of the chicken mite *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Exp. Appl. Acarol* 1992; 15: 27-40.
105. Nordenfors H, Hoglund J, Uggla A. Effects of temperature and humidity on oviposition, molting, and longevity of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *J Appl Entomol* 1999; 36: 68-72.
106. Othman RA, Abdallah JM, Abo-Omar J. Prevalence of the red mite (*Dermanyssus gallinae*) in layer flocks in four districts in northern West Bank, Palestine. *Open J Anim Sci* 2012; 2: 106-109.
107. Li J, Li Y, Sun J, et al. COI barcoding as a molecular assay for the identification of phytoseiid mites. *Syst Appl Acarol* 2012; 17: 397-406.
108. Navajas M, Fenton B. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Exp. Appl. Acarol* 2000; 24: 751-774.
109. Dona J, Diaz-Real J, Mironov S, et al. DNA barcoding and minibarcoding as a powerful tool for feather mite studies. *Mol Ecol Resour* 2015; 15: 1216-1225.
110. Navajas M, Lagnel J, Gutierrez J, et al. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity* 1998; 80: 742-752.
111. Okassa M, Kreiter S, Tixier MS. Obtaining molecular data for all life stages of *Typhlodromus* (*Typhlodromus*) *exhilaratus* (Mesostigmata: Phytoseiidae): consequences for species identification. *Exp. Appl. Acarol* 2012; 57: 105-116.

112. Hajibabaei M, Singer GA, Hebert PD, et al. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TIG* 2007; 23: 167-172.
113. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Med* 2003; 270: 313-321.
114. Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Med* 2003; 270: 96-99.
115. Hebert PD, Penton EH, Burns JM, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 14812-14817.
116. Marangi M, de Luna CJ, Cafiero MA, et al. Phylogenetic relationship between *Dermanyssus gallinae* populations in European countries based on mitochondrial COI gene sequences. *Exp. Appl. Acarol* 2009; 48: 143-155.
117. Barker SC. Distinguishing species and populations of rhipicephaline ticks with its 2 ribosomal RNA. *J Parasitol* 1998; 84: 887-892.
118. Zhu X, Gasser RB, Podolska M, et al. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol* 1998; 28: 1911-1921.
119. Zhu XQ, D'Amelio S, Gasser RB, et al. Practical PCR tools for the delineation of *Contracaecum rudolphii* A and *Contracaecum rudolphii* B (Ascaridoidea: Anisakidae) using genetic markers in nuclear ribosomal DNA. *Mol Cell Probes* 2007; 21: 97-102.
120. Fukunaga M, Yabuki M, Hamase A, et al. Molecular phylogenetic analysis of ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences. *J Parasitol* 2000; 86: 38-43.
121. Li A, Wu X, Xie M, et al. PCR-based identification and delineation of members within the *Pseudorhabdosynochus lantauensis* complex (Monogenea: Diplectanidae). *Parasitology res* 2005; 98: 34-37.
122. Murrell A, Campbell NJH, Barker SC. Recurrent gains and losses of large (84-109 bp) repeats in the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) of rhipicephaline ticks. *Mol Biol* 2001; 10: 587-596.
123. Zahler M, Gothe R. Evidence for the reproductive isolation of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) ticks based on cross-breeding, morphology and molecular studies. *Exp. Appl. Acarol* 1997; 21: 685-696.
124. Roy L, Dowling APG, Chauve CM, et al. Molecular phylogenetic assessment of host range in five *Dermanyssus* species. *Exp. Appl. Acarol* 2009; 48: 115-142.
125. DeClerq J, Nachtegaele L. *Dermanyssus gallinae* infestation in a dog. *Canine Practice* 1993; 18: 34-36.
126. Grant DI. Parasitic skin diseases in cats. *J Small Anim Pract* 1989; 30: 250-254.
127. Ramsay GW, Mason PC, Hunter AC. Chicken mite (*Dermanyssus gallinae*) infesting a dog. *New Zeal Vet J* 1975; 23: 155-156.

128. Mignon B, Losson B. Dermatitis in a horse associated with the poultry mite (*Dermanyssus gallinae*). Vet Dermatol 2008; 19: 38-43.
129. Dorny P, Wyngaarden Tv, Vercruysse J, et al. Survey on the importance of mange in the aetiology of skin lesions in goats in Peninsular Malaysia. Trop Anim Health Prod 1994; 26: 81-86.
130. Allymehr M, Tavassoli M, Manoochehri MH, et al. Ectoparasites and gastrointestinal helminths of house mice (*Mus musculus*) from poultry houses in Northwest Iran. Comp Parasitol 2012; 79: 283-287.
131. Lucky AW, Sayers CP, Argus JD, et al. Avian mite bites acquired from a new source-pet gerbils. Archives Dermatol 2001; 137: 167-170.
132. Kirkwood AC. In vitro feeding of *Dermanyssus gallinae*. Exp. Parasitol 1971; 29: 1-6.
133. Huong CT, Murano T, Uno Y, et al. Molecular detection of avian pathogens in poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) collected in chicken farms. J Vet Med Sci 2014; 76: 1583-1587.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Zekiye KOÇER

Uyruğu: (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 13 Ocak 1989, Mersin

Medeni Durumu: Bekar

Tel: +90 506 349 9812

email: zekiyekocer@gmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı,
Melikgazi/ KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lise	Melikgazi Mustafa Eminoğlu Lisesi/Kayseri	2006
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi/Biyoloji Bölümü	2011
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Parazitoloji	

YABANCI DİL

İngilizce