T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

KOYUNLARDA *HAEMONCHUS CONTORTUS*'UN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE BENZİMİDAZOL DİRENÇLİLİĞİNİN MOLEKÜLER OLARAK ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Zuhal ÖNDER

Danışman
Prof. Dr. Alpaslan YILDIRIM

Doktora Tezi

Mayıs 2014
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

KOYUNLARDA *HAEMONCHUS CONTORTUS*'UN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE BENZİMİDAZOL DİRENÇLİLİĞİNİN MOLEKÜLER OLARAK ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Zuhal ÖNDER

Danışman
Prof. Dr. Alpaslan YILDIRIM

Doktora Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSD-12-4054 nolu proje ile desteklenmiştir.

Mayıs 2014
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: Zuhal ÖNDER

İmza :



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"**Koyunlarda *Haemonchus contortus*'un Moleküler Karakterizasyonu ve Benzimidazol Dirençliliğinin Moleküler Olarak Araştırılması**" başlıklı doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Zuhal ÖNDER

Danışman
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM danışmanlığında **Zuhal ÖNDER** tarafından hazırlanan "**Koyunlarda *Haemonchus contortus*'un Moleküler Karakterizasyonu ve Benzimidazol Dirençliliğinin Moleküler Olarak Araştırılması**" konulu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Parazitoloji** Anabilim Dalı'nda **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

08/05/2014

JÜRİ : **İmza**

Üye : Prof. Dr. Abdullah İNCİ (Vet. Fak. Parazitoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Süleyman YAZAR (Tıp Fak. Parazitoloji AD)

Üye: Prof. Dr. Ahmet DOĞANAY (Ankara Üniv.Vet. Fak)

Üye : Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM (Vet. Fak. Parazitoloji AD)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ (Vet. Fak. Parazitoloji AD)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 23.05.2014 tarih ve...629....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

23./05./2014

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
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 duygularımla teşekkür ederim.

Parazitoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladığım günden bu yana desteğini gördüğüm değerli hocalarım Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdullah İNCİ ve Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ ile Araş. Gör. Arif ÇİLOĞLU'na, TAGEM tarafından desteklenen ve "Halk Elinde Küçükbaş Islah Projesi Kapsamındaki Akkaraman Irkının Halk Elinde Islahı" başlıklı araştırma projesi kapsamında çalışma materyalinin temininde yardımcı olan proje yürütücüsü Sayın Yrd. Doç. Dr. Davut BAYRAM ve proje ekibine, veteriner hekim arkadaşlarıma, laboratuvar çalışmalarıma yardımcı olan yüksek lisans öğrencileri Biyolog Zekiye KOÇER, Vet. Hek. Gamze YETİŞMİŞ, Biyolog Gözde ŞAHİNGÖZ'e ve çalışma süresince malzeme bazında TSD-12-4054 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 sevgili eşime ve yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için aileme teşekkürü borç bilirim.

KOYUNLARDA *HAEMONCHUS CONTORTUS*'UN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE BENZİMİDAZOL DİRENÇLİLİĞİNİN MOLEKÜLER OLARAK ARAŞTIRILMASI

Zuhal ÖNDER

T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Mayıs 2014
Danışman: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

ÖZET

Bu çalışma, Kayseri yöresinde koyunlarda *Haemonchus contortus*'un moleküler prevalansı ve karakterizasyonu ile benzimidazol dirençliliğinin moleküler olarak araştırılması amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla 2012-2013 yılları arasında Kayseri'nin İncesu, Erkilet ve Bünyan ilçelerinde çeşitli koyunculuk işletmelerinde toplam 300 baş akkaraman ırkı koyundan tekniğine uygun olarak dışkı örneği toplanmıştır. Toplanan dışkılar çinko sülfat flotasyon yöntemi ile mikroskobik olarak parazit yumurta/ookistleri yönünden incelenmiştir. Konvansiyonel dışkı muayenesi sonucunda, incelemesi yapılan koyunların 244'ü (%73,2) çeşitli parazit yumurta ve/veya ookistleri yönünden pozitif bulunmuştur. En yaygın türler %48,3 ile Trichostrongylid tip etkenler belirlenmiş bunu sırasıyla %36,7 ile *Marshallagia* sp., % 28,3 ile *Eimeria* sp., %14,3 ile *Nematodirus* sp., %4,3 ile *Moniezia* sp. ve %1.7 ile *Trichuris ovis* izlemiştir. Trichostrongylid türlerle enfekte koyunlarda gram dışkıdaki yumurta sayısı (EPG) ortalama 120,3±53,5 olarak belirlenmiştir. EPG düzeylerinin 2 yaş üzeri koyunlarda iki yaş altına göre yaklaşık 2 kat yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Trcihostrongylid yumurtalar yönünden pozitif belirlenen 145 örneğin dışkılarından genomik DNA ekstraksiyonunu takiben elde edilen DNA'lar *H. contortus* tür spesifik ribosomal complete internal transcript spacer 2 (ITS-2) gen bölgesini amplifiye eden primerler ve TaqMan probu ile Real Time PCR analizine tabii tutulmuştur. İncelenen örneklerin 36'sı (%24,8) *H. contortus* yönünden pozitif belirlenmiş olup ortalama Ct (dR) değeri 30,9±3,38 bulunmuştur. Belirlenen Ct (dR) değerlerine göre >2 yaş grubunda paraziteminin ≤ 2 yaş grubuna oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Real Time PCR analizleri sonucu *H. contortus* pozitif belirlenen örneklerin filogenetik analizleri için ITS-2 rDNA ve mitokondriyal cytochrome oxidase subunit 1 (mt-COI) gen bölgelerini amplifiye eden spesifik primerler ile PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. İzolatlara ait amplikonların PCR primerleri ile ve/veya klonlanlanıp plasmid pürifikasyonundan sonra sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatların GenBank kayıtları yapılmış ve dünyadaki benzer izolatlar ile çoklu hizalamaları yapılarak filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. ITS-2

nükleotid sekansları ortaya konan 4 *H. contortus* izolatının (TrERUHcon04, TrERUHcon05, TrERUHcon06, TrERUHcon07) pairwise analizleri sonucu %100,0 identik oldukları, Dünyanın farklı bölgelerinden GenBank'a kayıtlı benzer izolatlarla ise ortalama %0,1 genetik farklılık gösterdikleri tespit edilmiştir. Mt-COI gen bölgesine göre incelenen izolatların (TrERUHcon01, TrERUHcon02, TrERUHcon03) pairwise analizleri sonucu %96,3-%100,0 identik oldukları, dünyada GenBank'a kayıtlı az sayıdaki izolatlarla ise %5,3±0,6 genetik farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. Çalışmada *H. contortus* pozitifliği belirlenen 36 örnekte benzimidazol dirençliliğini araştırmak amacıyla β tubulin izotip-1 gen bölgesindeki duyarlı ve dirençli allellere spesifik TaqMan probları ve primerler ile Real time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Real time PCR analizleri sonucu *H. contortus* popülasyonlarında benzimidazol dirençliliği açısından duyarlı allel sıklığı %87,12±16,19, dirençli allel sıklığı ise %12,88±16,19 olarak belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Çalışmada ayrıca duyarlı ve dirençli allel sıklıklarına göre belirlenen bazı izolatlarda β tubulin izotip-1 gen bölgesinin sekansları belirlenmiş ve benzimidazol dirençliliği açısından tek nükleotid polimorfizmleri araştırılmıştır. Duyarlı allele ait izolatların hiçbirinde polimorfizm görülmezken dirençli allele ait iki izolatın β tubulin izotip-1 gen bölgesinin 200. kodonunda tek nükleotid polimorfizmi gösterdiği ve fenilalanin (TTC) amino asidinin tirozin amino asitine (TAC) dönüştüğü saptanmıştır. Duyarlı ve dirençli allellere ait izolatların GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez koyunlarda *H. contortus*'un moleküler prevalansı belirlenmiş ve genetik karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışma ile araştırma yöresinde *H. contortus* popülasyonlarında benzimidazol dirençliliği moleküler olarak ortaya konmuş, duyarlı ve dirençli allel sıklıkları belirlenerek risk faktörleri saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, dirençli *H. contortus* popülasyonu dinamikleri açısından tedavi ve ilaçlama yöntemlerinin gözden geçirilmesi ve alternatif stratejilerin oluşturulmasının zorunlu olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Anahtar kelimeler: Benzimidazol dirençliliği, *Haemonchus contortus*, Koyun, Moleküler karakterizasyon, Real time PCR

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *HAEMONCHUS CONTORTUS* IN SHEEP AND MOLECULAR INVESTIGATION OF BENZIMIDAZOLE RESISTANCE

Zuhal ÖNDER

Erciyes University, Graduate School of Health Science
Department of Veterinary Parasitology
Doctor's Thesis, May 2014
Supervisor: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the molecular prevalence and characterization of *Haemonchus contortus* and as well as benzimidazole resistance in *H. contortus* populations in sheep from Kayseri and vicinity. For this aim between 2012 and 2013 feces samples were techniqually collected from totally 300 Akkaraman sheep raised in several sheep farms in İncesu, Erkilet and Bünyan districts of Kayseri. Collected feces samples were analyzed by zinc sulfate flotation technique in order to investigate the parasite eggs/oocysts under light microscope. 244 (73.2%) out of examined sheep were found to be positive with several parasite eggs and/or oocysts. Trichostrongylids were found to be the most prevalent species with the raito of 48.3% and this ratio was followed by *Marshallagia* sp., *Eimeria* sp., *Nematodirus* sp., *Moniezia* sp. and *Trichuris ovis* with the ratios 36.7%, 28.3%, 14.3%, 4.3% and 1.7%, respectively. The mean egg per gram of feces (EPG) value in sheep infected with trichostrongylids was determined as 120.3±53.5. The EPG levels in sheep >2 years age group was determined twice higher than ≤2 years age group ($p<0.05$). Genomic DNA extractions were performed on 145 samples which were found positive for trichostrongylid eggs and TaqMan Probe based Real Time PCR analyses were done on the obtained DNAs with the specific primers and probe that amplified ribosomal complete internal transcript spacer 2 (ITS's-2) gen region. 36 (24.8%) out of 145 samples were determined positive for *H. contortus* with a mean Ct (dR) value of 30.9±3.38. Parasitemia was determined higher in >2 years age group than ≤2 years age group based on the obtained Ct (dR) values ($p<0.05$). In order to phylogenetic analyses of *H. contortus* in positive samples, PCR analyses were performed with the primer pairs specific to ITS-2 rDNA and mitokondriyal cytochrome oxidase subunit 1 gene regions (mt-COI). Sequence analyses of the isolates were done directly with PCR primers and/or after cloning and plasmid purifications. The obtained isolates were deposited to the GenBank and phylogenetic analyses were carried out by multiple alignments of the isolates with the similar ones available in GenBank in the world. The 4 *H. contortus* isolates (TrERUHcon04,

TrERUHcon05, TrERUHcon06, TrERUHcon07) which the ITS-2 nucleotide sequences determined, showed 100.0% identity to each other and 0.1% genetic difference with the isolates from different parts of the world in the GenBank. The pairwise analyses of the isolates (TrERUHcon01, TrERUHcon02, TrERUHcon03) characterized by Mt-COI sequences showed 96.3%-100.0% identity to each other and also they exhibited 5.3±0.6% genetic difference with the few isolates from the World in GenBank. TaqMan based Real Time PCR analyses were performed on totally 36 *H. contortus* positive samples with the primers and probes specific to β tubulin isotipe-1 gene region of sensitive and resistant alleles in order to investigate benzimidazole resistance. Sensitive and resistant allele frequencies by means of benzimidazole resistance in *H. contortus* populations were determined as 87.12%±16.19 and 12.88%±16.19, respectively in Real Time PCR assays and the difference between sensitive and resistant allele frequencies was found statistically significant ($p<0.05$). β tubulin isotipe-1 gene sequences of some isolates which were selected by means of sensitive and resistant allele frequencies were also determined and single nucleotide polymorphisms (SNPs) were investigated according to the benzimidazole resistance. No polymorphism was seen in all the isolates belong to sensitive allele whereas SNPs were detected in the codon 200 of the two isolates belong to resistant allele and transformation of phenylalanine (TTC) to tyrosine (TAC) at this codon was determined in both isolates. The isolates belong to sensitive and resistant alleles were also deposited to the GenBank.

In conclusion, molecular prevalence and genetic characterization of *H. contortus* in sheep in Turkey were determined for the first time with this study. Benzimidazole resistance was molecularly detected in *H. contortus* populations in the research area and also risk factors were determined by revealing the sensitive and resistant allele frequencies. The obtained results from this study revealed that revising the treatment and disinfection methods in terms of resistant *H. contortus* population dynamics and also producing new alternative strategies are essential.

Key words: Benzimidazole resistance, *Haemonchus contortus*, Sheep, Molecular characterization, Real time PCR

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

İÇ KAPAK i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI iii
KABUL VE ONAY SAYFASI iv
TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
ABSTRACT viii
İÇİNDEKİLER x
KISALTMALAR xiii
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ xiv

1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 3
2.1. *HAEMONCHUS CONTORTUS*'UN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ 3
2.2. *HAEMONCHUS CONTORTUS'UN* MORFOLOJİSİ 5
2.3. BİYOLOJİ 6
2.4. EPİDEMİYOLOJİ 7
2.4.1. İç Faktörler (Parazit) 8
2.4.2. Dış faktörler 8
2.4.2.1. Çevre 8
2.4.2.2. Konak 8
2.4.3. Haemonchosis'in Türkiye'deki Yayılışı 9
2.4.4. Haemonchosis'in Dünya'daki Yayılışı 12
2.5. PATOGENEZ 14
2.6. KONAK İMMUN YAPISI 16
2.7. AŞI GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI 18
2.8. HAEMONCHOSİS'TE TANI 20
2.8.1. Klinik ve Nekropsi Bulguları 20
2.8.2. Dışkı Bakısı Yöntemleri 23
2.8.3. Serolojik Yöntemler 24
2.8.4. Moleküler Yöntemler 25

Sayfa no

2.9. TEDAVİ 26
2.9.1. Benzimidazoller 28
2.9.2. Imidazothiazolller 29
2.9.3. Macrocyclic laktonlar (Ivermectin) 29
2.9.4. Praziquantel 29
2.9.5. Closantel 29
2.10. ANTİHELMİNTİK DİRENÇLİLİĞİ 30
2.11. ANTİHELMİNTİK DİRENÇLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ 34
2.11.1. In vivo Teknikler 34
2.11.2. In vitro Teknikler 35
2.12. KORUNMA VE KONTROL 37
2.12.1. Mantar kullanımı 37
2.12.2. Bakteri kullanımı 38
2.12.3. Doğal bitki ekstraklarının kullanımı 38
2.12.4. Bakır kullanımı 38
2.12.5. Tanenler 39
3. GEREÇ VE YÖNTEM 41
3.1. SAHA ÇALIŞMALARI 41
3.1.1. Araştırma Sahası 41
3.1.2. Dışkı Örneklerinin Toplanması 42
3.2. LABARATUVAR ÇALIŞMALARI 43
3.2.1. Konvansiyonel Dışkı Muayenesi 43
3.2.2. Gram Dışkıdaki Yumurta Sayısının (EPG) Belirlenmesi 43
3.2.3. Genomik DNA Ekstraksiyonu 44
3.2.4. Taqman Prob Bazlı Real Time PCR Analizleri 46
3.2.5. Ribozomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS-2) Geninin Amplifikasyonu 47
3.2.6. Mitokondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 (mt-COI) Geninin Amplifikasyonu 48
3.2.7. PCR Ürünlerinin Elektroforez ile Görüntülenmesi 49
3.2.8. *Haemonchus contortus* ITS-2 Gen Bölgesinin Sekansı ve Filogenetik Analizi 49
3.2.9. Beta Tubulin İzotip-1 Geni Tek Nükleotid Polimorfizminin (SNP) Real Time PCR ile Araştırılması ve Allel Sıklıklarının Belirlenmesi 50
3.2.10. β tubulin izotip-1 Geninin Amplifikasyonu 51

Sayfa no

3.2.11. *Haemonchus contortus* mt-COI ve β tubulin izotip-1 Genlerinin Klonlanması…… ……51
3.2.12. Klonlanan mt-COI ve β tubulin izotip-1 Gen Bölgelerinin Sekans, Filogenetik ve SNPs Analizleri..... …55
3.2.13. İstatiksel Analiz..... ... 55
4. BULGULAR 56
4.1. Konvansiyonel Dışkı Muayenesi Sonuçları 56
4.2. Gram Dışkıdaki Yumurta Sayısının Belirlenmesi 62
4.3. Real Time PCR Sonuçları 64
4.4. ITS-2 Geninin Amplifikasyonu ve Sekans Analizi 67
4.5. *H. contortus* izolatlarının ITS-2 Geninin Moleküler Karakterizasyonu ve Filogenetik Analizi 71
4.6. Mitokondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 Geninin Amplifikasyonu..... 78
4.7. Beta Tubulin İzotip-1 Geninde Tek Nükleotid Polimorfizminin (SNP) Real Time PCR ile Analiz Sonuçları..... 78
4.8. β tubulin izotip-1 Geninin Amplifikasyon Sonucu 83
4.9. Mt-COI ve β tubulin izotip-1 Gen Bölgelerinin Klonlama Sonuçları..... 84
4.10. Mt-COI Geninin Sekans ve Filogenetik Analizi 87
4.11. β tubulin İzotip Tip 1 Geninin Sekans ve SNPs Analizi 100
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 103
6. KAYNAKLAR 118
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR

Internal transcribed spacer 1 : ITS-1

Mitochondrial cytochrome oxidase : mt-COI

Tek nükleotid polimorfizmleri : SNPs

Gastrointestinal nematodlar : GIN

Toplam hücre hacmi : PCV

Bağırsak membran sistein protezlar : TSBP

Glutamate dehidrogenaz : GDH

Gram dışkıdaki yumurta sayısı : EPG

Enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA

Hemagglutination : HA

Complement fixation : CF

Nicotinic acetylcholine : nACh

Gamma-amino butyric aciti : GABA

P-glikoprotein : Pgp

Glutamat girişli klorid kanalı :GluCl

Dışkıda yumurta sayısı azalım testi : FECRT

Kontrol etkinlik testi : CET

Yumurtadan çıkış testi : EHA

Larva beslenmesini önleme testi : LFIA

Larva gelişim testi : LDA

Bakır : Copper oxide wire particles-COWP

CT : Kondanse tanenler

External transcribed spacer : ETS

Non transcribed spacers : NTS

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. *H.contortus*'un sistematikteki yeri……..3

Tablo 2.2. *Haemonchus* türleri ve konakları……4

Tablo 2.3. Yaygın olarak kullanılan antihelmintiklerin hedef alanları…….28

Tablo 2.4. Antihelmintik dirençlilik mekanizması ..... .31

Tablo 3.1. 2012-2013 yılları arasında Kayseri yöresinde örneklenen koyunların örnekleme merkezi, yaş ve cinsiyete göre dağılımları..... .42

Tablo 3.2. *H. contortus*'un ITS-2 gen bölgesinin tespiti için Real Time PCR'da kullanılan primerler ve TaqMan prob ..... .47

Tablo 3.3. *H. contortus'*un β tubulin izotip-1 gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizminin tespiti için Real Time PCR'da kullanılan primerler..... .50

Tablo 4.1. İncelemesi yapılan koyunlarda dışkı muayenesine göre belirlenen parazitlerin araştırma bölgesi ile koyunların cinsiyet ve yaşına göre dağılımları..... 57

Tablo 4.2. Koyunların tek ve daha fazla türle enfeksiyon durumları..... 61

Tablo 4.3. Trichostrongylid yumurtaları yönünden pozitif bulunan koyunlarda saptanan EPG değerleri..... 62

Tablo 4.4. Real Time PCR incelemesi yapılan koyunlarda *H. contortus* pozitifliğinin örnekleme merkezi, yaş grupları ve cinsiyete göre dağılımı 65

Tablo 4.5. Real Time PCR ile *H. contortus* pozitif saptanan örneklerde saptanan Ct (dR) değerlerinin araştırma bölgesi, yaş grupları ve cinsiyete göre dağılımı ve istatistiksel analizleri 67

Tablo 4.6. Kayseri yöresinde koyunlarda belirlenen *H. contortus* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler ve GenBank aksesyon numaraları 69

Tablo 4.7. Araştırma yöresinde belirlenen *H. contortus* izolatları ile Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer *H. contortus* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler..... 72

Tablo 4.8. ITS-2 gen bölgesi yönünden multiple alignmentları yapılan *H. contortus* izolatlarının nükleotid kompozisyonları..... 73

Tablo 4.9. Kayseri yöresi *H. contortus* izolatları ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı *H. contortus* izolatların ITS-2 gen dizilimlerinin pairwise analizleri..... 74

Tablo 4.10. *H. contortus* pozitif örneklerde benzimidazol dirençliliği yönünden Real Time PCR ile belirlenen eşik döngü değerleri [Ct (dR)] ve allel sıklıkları..... 80

Tablo 4.11. Benzimidazol duyarlı ve dirençli allel sıklıklarının istatistiksel analizi 81

Tablo 4.12. Real Time PCR ile benzimidazol duyarlı *H. contortus* nesillerinde saptanan Ct (dR) değerlerinin araştırma bölgesi, yaş grupları ve cinsiyete göre dağılımı ve istatistiksel analizleri..... 82

Tablo 4.13. Kayseri yöresinde koyunlarında belirlenen *H. contortus* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları 87

Tablo 4.14. Kayseri yöresinde koyunlardan elde edilen *H. contortus* izolatlarıyla Dünyadan mt-COI gen bölgesi yönünden filogenetik kıyaslaması yapılan diğer nematodlara ait izolatların aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler. …..90

Tablo 4.15. Mt-COI gen bölgesi yönünden multiple alignmentları yapılan izolatların nükleotid kompozisyonları..... …..91

Tablo 4.16. GenBank'a kayıtları yapılan Kayseri *H. contortus* izolatlarının ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların mt-COI gen dizilimlerinin pairwise analizleri ..... …..92

Tablo 4.17. Kayseri yöresinde koyun dışkısında belirlenen *H. contortus* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları..... …101

Şekil 2.1. Ergin dişi ve erkek *H. contortus*'un morfolojisi ..... ….6

Şekil 2.2. *H. contortus*'un yaşam döngüsü. ..... ….7

Şekil 2.3. *H. contortus* ile enfekte koyunların abomazum mukozasında oluşan nodüller….15

Şekil 2.4. Haemonchosis'de çene altı ödemi ..... …21

Şekil 2.5. Haemonchosis'de anemi ..... …21

Şekil 2.6. FAMACHA© göz rengi kartı..... …23

Şekil 3.1. Örnekleme yapılan istasyonlar..... …42

Şekil 3.2. Saha çalışmaları ..... …43

Şekil 3.3. pJET1.2/blunt CloningVector. ..... …52

Şekil 3.4. Aval ve Xbal (Thermo Scientific) enzimlerinin bağlanma noktaları..... …54

Şekil 4.1. Enfekte koyun dışkısında saptanan Trichostrongylid tip yumurta..... …58

Şekil 4.2. Enfekte koyun dışkısında saptanan *Marshallagia* sp. yumurtası..... …58

Şekil 4.3. Enfekte koyun dışkısında saptanan *Eimeria sp.* oocysti ..... …59

Şekil 4.4. Enfekte koyun dışkısında saptanan *Nematodirus sp.* yumurtası..... …59

Şekil 4.5. Enfekte koyun dışkısında saptanan *Moniezia sp.* yumurtası ..... …60

Şekil 4.6. Enfekte koyun dışkısında saptanan *Trichuris ovis* yumurtası..... …60

Şekil 4.7. Enfekte bulunan koyunlarda belirlenen parazitlerin yüzdesel dağılımı..... …61

Şekil 4.8. Koyunların bir ve daha fazla parazitle enfeksiyonların dağılımı..... …62

Şekil 4.9. Enfekte hayvanlarda belirlenen ortalama EPG değerlerinin araştırma merkezlerine göre dağılımları ..... …63

Şekil 4.10. Enfekte hayvanlarda belirlenen ortalama EPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımları ..... ….63

Şekil 4.11. Enfekte hayvanlarda belirlenen ortalama EPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımları..... …64

Şekil 4.12. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu *H. contortus* pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon grafikleri..... …66

Şekil 4.13. Real Time PCR'da *H. contortus* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı 66

Şekil 4.14. *H. contortus* ITS-2 gen bölgesini hedef alan orijinal primer dizilerinin çeşitli trichostrongylid türlerine ait izolatların sekans dizileri ile hizalamaları ve spesifiteleri..... …68
Şekil 4.15. *H. contortus* pozitif izolatların parsiyel ITS-2 gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü ..... …69
Şekil 4.16. *H. contortus* izolatlarının tekrar jel pürifikasyon sonrası amplikonların jel elektroforezde görünümü. ..... …69
Şekil 4.17. TrERUHcon04 izolatının complete ITS-2/partial 28S rRNA nükleotit dizilimleri ..... …70
Şekil 4.18. TrERUHcon05 izolatının complete ITS-2/partial 28S rRNA nükleotit dizilimleri ..... …70
Şekil 4.19. TrERUHcon06 izolatının complete ITS-2/partial 28S rRNA nükleotit dizilimleri ..... …71
Şekil 4.20. TrERUHcon07 izolatının complete ITS-2/partial 28S rRNA nükleotit dizilimleri ..... …71
Şekil 4.21. Kayseri yöresinde koyunlarda belirlenen *H. contortus* izolatları ile Dünyadaki diğer bazı *H. contortus* izolatlarının complete ITS-2 gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları..... …75
Şekil 4.22. Kayseri yöresinde saptanan *H. contortus* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların complete ITS-2 gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri ..... …77
Şekil 4.23. *H. contortus* pozitif izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü ..... …78
Şekil 4.24. TaqMan prob Real Time PCR analizleri sonucu *H. contortus* duyarlı allellerin amplifikasyon eğrileri ..... …79
Şekil 4.25. TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizleri sonucu *H. contortus* dirençli allellerin amplifikasyon eğrileri..... …79
Şekil 4.26. Real Time PCR'da β tubulin izotip-1 gen bölgesine göre benzimidazol duyarlı ve dirençli *H. contortus* nesillerinin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı... ..... …80
Şekil 4.27. Araştırma yöresinde benzimidazol duyarlı ve dirençli *H. contortus* nesillerinin allel sıklıklarına göre dağılımı... ..... …81
Şekil 4.28. Benzimidazol duyarlı ve dirençli allel sıklıklarının araştırma merkezlerine göre dağılımı... ..... …82
Şekil 4.29. Benzimidazol duyarlı ve dirençli allel sıklıklarının yaş gruplarına göre dağılımı ..... …83
Şekil 4.30. Benzimidazol duyarlı ve dirençli allel sıklıklarının cinsiyete göre dağılımı .... …83
Şekil 4.31. *H. contortus* izolatlarının β tubulin izotip-1 gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü..... …84
Şekil 4.32. Transformasyon sonucu besi yerinde oluşan koloniler..... …85
Şekil 4.33. Transformasyon basamağında 2. inkübasyon basamağı sonucu oluşan koloniler ..... …85
Şekil 4.34. Transforme hücrelerde β tubulin izotip-1 gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü ..... …86
Şekil 4.35. Transforme hücrelerde mt-COI gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü..... …86
Şekil 4.36. Saflaştırılan plasmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu izolatların β tubulin izotip-1 gen bölgesine ait DNA'ların agaroz jelde görünümü ..... …87
Şekil 4.37. Saflaştırılan plasmidlerin restrüksiyon enzimleri ile kesimi sonucu izolatların mt-COI gen bölgesine ait DNA'ların agaroz jelde görünümü ..... …87
Şekil 4.38. TrERUHcon01 izolatının sekans dizilimleri..... …88

Şekil 4.39. TrERUHcon02 izolatının sekans dizilimleri..... …88
Şekil 4.40. TrERUHcon03 izolatının sekans dizilimleri..... …89
Şekil 4.41. Kayseri yöresinde koyunlarda belirlenen *H. contortus* izolatları ile Dünyadaki diğer bazı nematodlara ait izolatlarının parsiyel mt-COI gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları ..... …93

Şekil 4.42. Kayseri yöresinde saptanan *H. contortus* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer Trichostrongylid nematodlara ait izolatların mt-COI gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları 100
Şekil 4.43. Benzimidazol duyarlı TrERUHcon08 izolatının β tubulin izotip-1 gen bölgesi nükleotid ve aminoasit sekansları 101
Şekil 4.44. Benzimidazol dirençli TrERUHcon09 izolatının β tubulin izotip-1 gen bölgesi nükleotid ve aminoasit sekansları ..... …102

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Nematoda filumunda, Secernentea sınıfında, Rhabditia alt sınıfında, Strongylida dizisi, Strongylina dizi altı, Trichostrongyloidea üst ailesi, Haemonchidae ailesi, Haemoncinae aile altında *Haemonchus* soyunda bulunan *H. contortus* tropik ve subtropik bölgelerde sığır, koyun, keçi, manda, zürafa, antilop ve yabani ruminantların abomazumlarına yerleşim göstermektedir (1, 2). Son yıllarda çeşitli ülkelerde küçük ruminantlarda büyüme geriliği, kilo kaybı, süt üretiminde azalma ve ölüm gibi ekonomik kayıplara neden olan gastrointestinal nematodlar üzerine filogenetik akrabalıklar ve antiparaziter dirençliliğin belirlenmesi gibi çeşitli moleküler tabanlı araştırmaların hız kazandığı görülmektedir. Türkiye'de gastrointestinal nematodlar üzerine yapılan çalışmaların mikroskobik ve nekropsi verilerine dayandığı, moleküler tabanlı çalışmaların ise bulunmadığı dikkati çekmektedir. Son yıllarda moleküler tabanlı tekniklerin parazitoloji alanında geniş bir şekilde uygulanmaya başlanması ile birlikte özellikle taksonomi, filogenetik akrabalıklar ve parazitlerin epidemiyolojisinde daha spesifik veriler ortaya konmuş olup bu tip çalışmalar gelişen bir ivme ile devam etmektedir. Bununla birlikte çoğu kez mikroskobik ve serolojik teşhis yöntemlerinde ortaya çıkan teşhis hataları ve düşük özgüllük, parazitlerin DNA'sını veya RNA'sını tespit etmeye yönelik moleküler teşhis yöntemlerinin kullanılmaya başlanması ile minimize edilmiştir. Moleküler teşhis yöntemleriyle birlikte, tespit edilen parazit türlerinin çeşitli gen bölgelerine göre moleküler karakterizasyonları yapılmakta ve evrimsel ve epidemiyolojik açıdan oldukça

önem arz eden Dünya'nın çeşitli bölgelerindeki benzer parazitlerle filogenetik ilişkileri saptanmaktadır. Real-time PCR tekniği, hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle son yıllarda öne çıkan tekniklerin başında gelmektedir. Ayrıca söz konusu teknik ile mutasyon analizleri ve gen ekspresyonları da hassas bir şekilde belirlenebilmektedir. Son yıllarda trichostrongylid nematodların spesifik teşhisinde de kullanılmaya başlanan başta 18S rRNA, 5.8S rRNA, 28S rRNA, Internal transcribed spacer 1 (ITS-1), ITS-2 ve mitochondrial cytochrome oxidase (mt-COI) gibi önemli gen bölgeleri hedef alınarak spesifik primer ve problar ile araştırmaların yapıldığı görülmektedir. Bu çalışmada, Kayseri yöresindeki sürülerden örneklenen koyunlarda konvansiyonel dışkı muayenesi sonrası standardize edilen TaqMan prob bazlı Real Time PCR tekniği ile *H. contortus* kantitatif olarak araştırılmıştır. Söz konusu teknik ile belirlenen pozitif izolatlar, filogenetik özelliklerinin ortaya konması amacıyla, ITS-2 ve mt-COI gen bölgeleri yönünden moleküler olarak karakterize edilmiş, Dünyadaki GenBank'a kayıtlı tüm izolatlarla alignmentları yapılarak nükleotit dizilimleri açısından benzerlik oranları tespit edilmiştir. Son yıllarda mide-bağırsak kıl kurtlarının tedavisinde yaygın ve gelişigüzel kullanılan benzimidazol grubu ilaçlara karşı bu parazitlerde direnç mekanizmaları geliştiği ortaya konmuştur. Bu parazitlerin en önemlilerinden biri de *H. contortus* olup, benzimidazole dirençliliği β tubulin izotip-1 geninde meydana gelen tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) sonucunda şekillenmektedir. Türkiye'de mide-bağırsak kıl kurtlarına karşı benzimidazol grubu ilaçlar çok yaygın kullanılmasına karşın antiparaziter dirençliliğe yönelik moleküler tabanlı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada moleküler olarak tür identifikasyonu ortaya konan *H. contortus* izolatlarında TaqMan prob bazlı Real Time PCR tekniği ile benzimidazol dirençliliği kantitatif olarak araştırılmış, duyarlı ve dirençli allel sıklıkları belirlenerek, bazı izolatların sekans analizleri ile SNPs analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ayrıca moleküler olarak karakterize edilen türlerin GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma, Türkiye'de bu alanda yapılmış olan ilk moleküler tabanlı çalışma olup elde edilen veriler Türkiye'de *H. contortus*'un spesifik teşhisi ile, moleküler karakterinin ortaya konması, bu gurup parazitlere karşı yaygın ve bilinçsizce kullanılan benzimidazol grubu ilaçlara karşı dirençliliğin moleküler olarak ortaya konması ve haemonchosis'in moleküler epidemiyolojisi açısından önem arz etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Haemonchus contortus tropik ve subtropik bölgelerde sığır, koyun, keçi, manda, zürafa, antilop ve yabani ruminantların abomazumlarına yerleşmektedir (2). Erişkin parazitler abomazum mukozasına tutunur ve kan ile beslenerek anemiye, şiddetli enfeksiyonlarda ise ölüme yol açarak ruminatların en patojen nematodlarından biri olmaktadır. Parazit aynı zamanda koyun ve keçilerde, büyüme geriliği, verim düşüklüğü, hematolojik ve biyokimyasal değişiklikler, iştahsızlık, kilo kaybı, protein miktarında azalma, sindirim sistemi bozuklukları, üreme performansının düşmesi, et ve yün kaybına neden olmaktadır (3-5). *Haemonchus contortus* enfeksiyonlarında önemli risk faktörlerinin birisi de çeşitli antihelmintik gruplara karşı direnç gelişimidir (6,7).

2.1. *HAEMONCHUS CONTORTUS*'UN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ

Haemonchus contortus'un National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy veritabanına göre sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir (1, 2, 4).

Tablo 2.1. *H.contortus*'un sistematikteki yeri

Sınıflandırma
Alem: Animalia C. Linnaeus, 1758
Şube: Nematoda Rudolphi, 1808
Sınıf: Secernentea Dougherty, 1958

Sınıfaltı: Rhabditida Chitwood, 1933
Takım: Strongylida Molin, 1861
Aile üstü: Trichostrongyloidea Cram, 1927
Aile: Haemonchidae Skrjabin ve Schulz, 1937
Aile altı: Haemoncinae Skrjabin ve Schulz, 1957
Cins: *Haemonchus* Cobb, 1898
Tür: *Haemonchus contortus* Rudolphi, 1803

Haemonchus contortus, ilk olarak 1803 yılında Karl Rudolphi tarafından *Strongylus contortus* olarak isimlendirilmiş, daha sonraları ise *Strongylus falicollis* (Molin, 1861), *Filaria dendiculata* (Simmonds, 1881) ve *Strongylus placei* (Place, 1893) olarak refere edilmiştir. Parazit 1900'lere kadar bu isimlerle anılmış, daha sonraları taksonomideki yeri *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) Cobb, 1898 olarak belirlenmiştir (8).

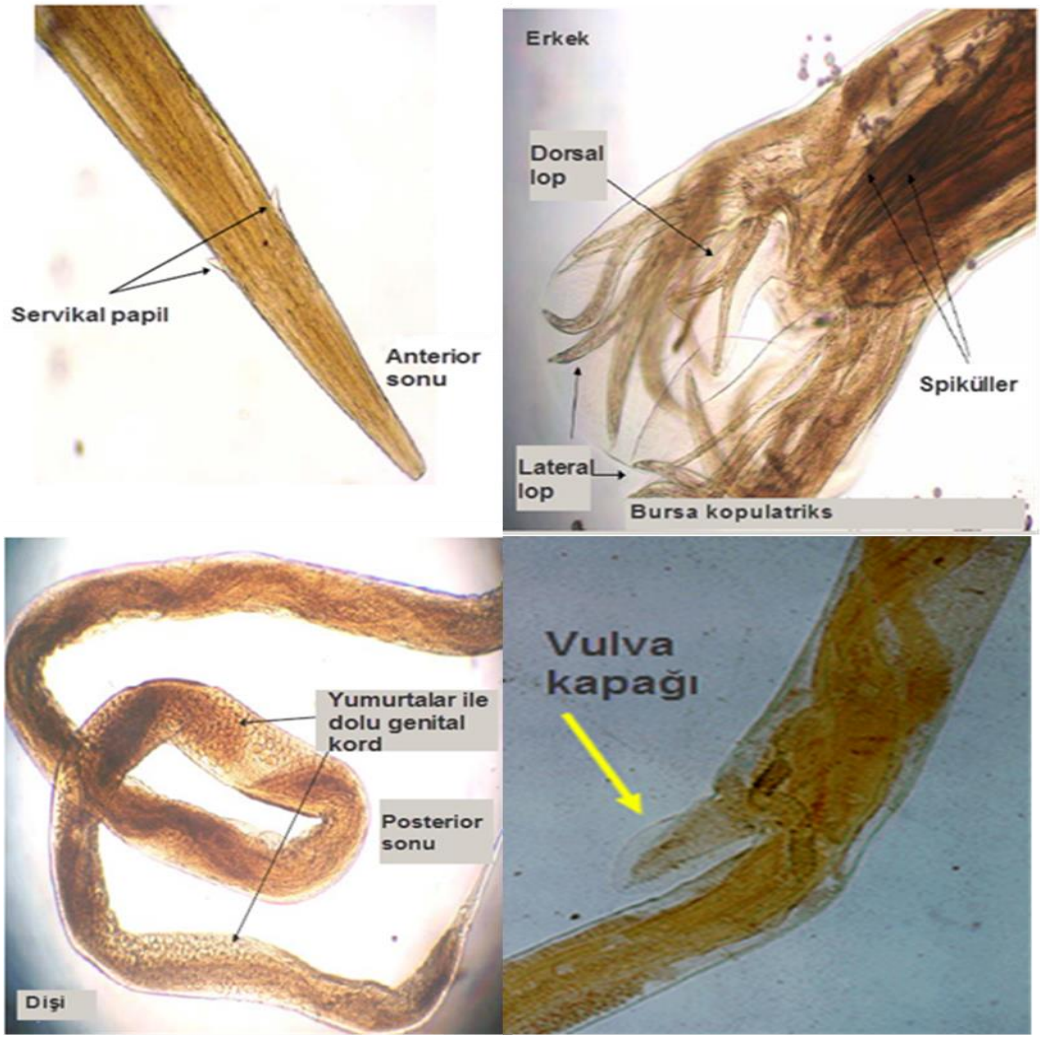
Günümüze kadar *Haemonchus* cinsine bağlı 12 farklı tür tanımlanmıştır. Bu türler ve konakları Tablo 2.2'de verilmiştir (2,9).

Tablo 2.2. *Haemonchus* türleri ve konakları

Türler	**Referans**	**Konak**
H. contortus	(Rudulphi, 1803) (Cobb, 898 (type for genus)	Koyun, keçi, sığır
H. longistipes	(Railliet & Henry, 1909)	Deve
H. placei	(Place, 1893)	Sığır
H. similis	(Travassos, 1914)	Sığır, geyik
H. mitchelli	(Le Roux, 1929)	Ceylan, boğa antilobu, afrika geyiği
H. bedfordi	(Le Roux, 1929)	Afrika bufalosu, çeşitli ceylanlar
H. vegliai	(Le Roux, 1929)	Afrika geyiği, antilop
H. lawrencei	(Sandground, 1933)	Antilop
H. okapiae	(van den Berghe, 1937)	Zürafa
H. krugeri	(Ortlepp, 1964)	Antilop
H. dinniki	(Sach, Gibbons & Lweno, 1973)	Ceylan
H. horaki	(Lichtenfels, Pilitt, Gibbons & Boomker, 2001)	Antilop

2.2. *HAEMONCHUS CONTORTUS'UN* MORFOLOJİSİ

Ergin dişi parazitler 18-30 mm uzunluğunda, yaklaşık 500 µm genişliğindedir. Ergin bir dişi parazit günde 10.000'den fazla yumurta yumurtlamaktadır. Kuyruk 400-630 µm uzunlukta olup, hızla incelir ve sivri olarak sonlanır. Vulva vücudun arka yarısında yer alır ve dil şeklinde bir kapağa sahiptir. Yumurtaları, 70-85 X 41-48 µm çapında strongil tip yumurtadır ve yumurta konağın dışkısına geçtiğinde embriyo 16-32 hücreye bölünür. Erkekleri hafif pembe renkli iken, dişilerin beyaz renkli ovaryumları kırmızı renkli bağırsakların etrafına dolanmış durumda olduğundan dalgalı beyaz, kırmızı-kahve renkli görünürler. Ergin erkekler ise 10-20 mm uzunluğunda, 400 µm genişliğinde ve dişilerden daha zayıftırlar. Servikal papil diken şeklindedir. Ağız kapsüllerinde diş ya da lanset tarzında kesici bir yapı bulunur. Erkeklerde bursa kopulatriks iki büyük lateral lop ve bir küçük asimetrik loba sahiptir. Dorsal lop, sol lobun tabanından çıkar ve dorsal kaburga tersine dönmüş "Y" harfi şeklindedir. Spikülümler 0.46-0.506 mm uzunluğundadır ve her biri küçük birer çıkıntı taşır (2, 10-13) (Şekil 2.1).

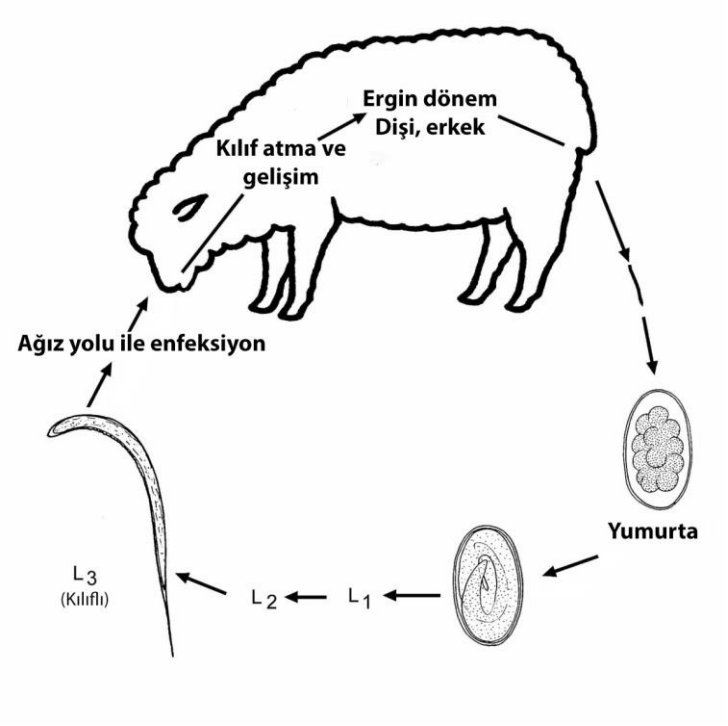


Şekil 2.1. Ergin dişi ve erkek *H. contortus*'un morfolojisi (**Kaynak**: Scheuerle, 2009: 13)

2.3. BİYOLOJİ

Haemonchus contortus'un preparazitik gelişimi diğer mide-bağırsak kıl kurtlarına benzemektedir. Parazit direkt yaşam siklusuna sahiptir. Dişilerin yumurtlama kapasitesi çok yüksektir. Ergin bir dişi parazit, günde 7000-10.000 yumurta yumurtlamaktadır. Hayvanların dışkısı ile dışarı atılan yumurtalar içerisinde birinci dönem larvalar (L1) gelişir ve yumurtayı terk ederler. Uygun nem ve ısı durumlarında L1'den üçüncü dönem larvaların (L3) gelişmesi için gerekli süre optimum koşullarda 5 gün olmasına rağmen, bu süre havaların serin olduğu durumlarda haftalar veya ayları bulmaktadır. Koyunlar otlarla birlikte L3'leri alarak enfekte olmaktadır. L3'ler özellikle yağış ile birlikte sabahın erken saatlerinde otların üst kısımlarına hareket ederler. Özellikle koyun yetiştiriciliğinde meraya hayvanların çıkarılışı da gündüz erken saatlerde olduğu için enfeksiyon riskini artırmaktadır. Alınan L3'lerin rumende ikinci

dönem larvadan (L2) kalma kılıfı atılır ve larvalar abomazuma göç ederek mide mukozasına penetre olurlar ve gömlek değiştirerek 4. dönem (L4) larva haline gelirler. 4. dönem larvalar ağız kapsüllerinde gelişen delici lanset yardımıyla kan damarlarından kan emerler. Kan emdikleri yerlerde kanamalara neden olduklarından hayvanda anemi şekillenir (2, 12, 14) (Şekil 2.2). İç ve dış çevre şartları (makro ve mikro çevresel durumlar, konağın immün yanıtı ve genetik yapısı) uygun olduğunda pre-patent süre koyunlarda yaklaşık 3, sığırlarda 4 haftadır. L4'ler soğuk, kuraklık ve aşırı sıcak gibi uygun olmayan koşullarda konakta hipobiyoza girererek metabolizma ve gelişimlerini yavaşlatırlar. Hipobiyoz kuraklık ve sıcaklığın arttığı yaz ortalarında başlar ve gittikçe artarak sonbaharda %70-80'lere, kışın ise %100'e ulaşır. Larvaların hipobiyozdan çıkması çevre koşullarının uygun hale gelmesi ile olur. Çevre koşullarının uygun hale gelmesi ile birlikte dördüncü dönem larvalar mide mukozasından ayrılarak mide lümenine gelir ve burada tekrar gömlek değiştirerek 5. dönem larva veya genç olgun haline gelirler. Seksüel olgunluğa erişen larvalar daha sonra çiftleşirler (11, 13,15-18).



Şekil 2.2. *H. contortus*'un yaşam döngüsü (**Kaynak:** Demeler J, 2005:3)

2.4. EPİDEMİYOLOJİ

Haemonchosis, dünyada tropikal, subtropikal ve benzer iklime sahip bölgelerde küçük ruminantlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Parazitin konak ve çevre ile etkileşimi sonucunda

hastalığın epidemiyolojisinde çeşitli iç (parazit) ve dış faktörler (yağış, çiğ vb.) rol oynamaktadır (13,19).

2.4.1 İç Faktörler (Parazit)

Haemonchus contortus üreme kabiliyeti oldukça yüksek, konağın immün reaksiyonlarından, uygun olmayan iklim koşullarından hızla kaçabilen ve kan emen bir parazittir. Dişilerin yaşamları boyunca çok sayıda yumurta üretmesi meranın kontamine olmasına neden olmaktadır. Hızlı ve sürekli reinfeksiyonlarda ise konaklarında uzun süre canlı kalabilmektedirler (20,21).

2.4.2. Dış faktörler

2.4.2.1. Çevre

İklim ve Vejetasyon: Parazitin gelişiminde ısı, yağış, nem ve bitki örtüsü önem taşımaktadır (22-24). Birçok tropikal ve subtropikal ülkelerde çevre sıcaklığı parazitin larval gelişimi için uygun olmaktadır. Mera ya da bitkilerin mikroklimasındaki birçok nematodun larval gelişimi için en ideal ısı 22-26 ^{o}C iken ideal nem oranı %100'e yakındır (13,24). 5 ^{o}C'nin altındaki ısılarda, L3'lerin metabolizması ve hareketi minumum düzeyde kalır ve larvaların etrafı çift katlı bir zar ile çevrilir. Böylece yeniden hareket etmek için beslenip enerji kazanabilmektedirler (25).

Beslenme: Sindirim sistemi nematod enfeksiyonlarında koyunların direnç ve dayanıklılığında beslenmenin ve özellikle protein ilavesinin büyük bir önemi bulunmaktadır. Yüksek oranda protein ile beslenen koyunlar parazit enfeksiyonlarında güçlü bir dirence sahip olmakta ve tedavileri daha az antihelmintik ile yapılabilmektedir (26). Besin kaynaklarının az olduğu ve/veya yanlış yönetimsel yaklaşımlar bazı yerlerde haemonchosis'in daha yaygın olarak görülmesine neden olmaktadır (13).

2.4.2.2. Konak

Konağın ırkı: Farklı koyun ırkları mide-bağırsak nematod enfeksiyonlarında farklı duyarlılığa sahiptir. Hayvanların *H. contortus*'a karşı dirençliliği genetik yapıları ile ilişkili olmakla birlikte seleksiyon ve koyun ırkı parazitlere karşı dirençliliği artırmaktadır (27, 28).

Konağın yaşı: Benzer koşullar altında farklı yaş ve cinsiyetteki hayvanlar parazitik enfeksiyonlara farklı şekillerde tepki göstermektedir. Genç hayvanlar parazitlerin neden olduğu hastalıklara genellikle ergin hayvanlardan daha duyarlıdırlar. Genç hayvanların daha düşük dirence sahip olması onların immunolojik toleransından ve immun sistemlerinin patojenlerle yeteri kadar karşılaşmamış olmasından kaynaklanmaktadır (29, 30). Kalıtsal

bağışıklık hayvanların yaşı ile alakalıdır ve birçok durumda önemli olmaktadır. Bu durum, genç hayvanlarda mide-bağırsak çevresinin farklı fiziko-kimyasal yapıya sahip olmasının bir sonucudur (31). Kuzuların sütten kesimi ile oluşan stres, koruyucu bağışıklığın gelişimini ertelemektedir (32). Diğer bir değişle, *H. contortus* enfeksiyonlarına yakalanan koyunlarda daha sonra aynı parazit ile karşılaşıldığında enfeksiyona karşı direnç artmaktadır.

Konağın cinsiyeti: Erkekler parazitik enfeksiyonlara dişilere göre daha duyarlıdırlar. Erkek kuzular dişilere göre çok sayıda *H. contortus* ergini taşırlar ve dışkıları ile çok sayıda yumurta atarak meranın daha fazla kontamine olmasına neden olurlar. Aynı zamanda kuzular ergin parazitlerin kan emmesinden dolayı da çok anemiktirler (33). Bu farklılık ise bağışıklıkta östrojen hormonunun uyarıcı etkisinden ve androjen hormonlarının karşı etkisinden kaynaklanmaktadır (34).

Konağın üreme durumu(Gebelik): Trichostrongylid nematodlarla enfekte koyunların dışkısı ile atılan yumurta sayısındaki doğum öncesi ve/veya doğum sonrası yükselme (Peri-Post Parturient Rise-PPR), koyunlardaki mide-bağırsak nematodlarının epidemiyolojisinde oldukça önem arz eden bir fenomendir. Gebe koyunlarda doğum öncesi dışkı ile atılan yumurta sayısındaki artış, 2-4 hafta içinde başlar ve laktasyon boyunca devam eder (35-37). Genellikle gebelik dönemindeki ve laktasyondaki koyunlarda kazanılmış bağışıklıkta geçici bir azalma meydana gelir ve bu durum dışkı ile atılan yumurta sayısında belirgin bir artışa yol açar (34, 38). Bu dönemdeki koyunlarda immunitedeki zayıflama hipofiz bezinin ön lobundan salgılanan bir salgı hormonu olan ve meme bezlerinden süt salgısını sağlayan prolaktin üretimine bağlı olarak endokrin orijinli olabileceği gibi ihtiyaç artışına bağlı olarak metabolizma proteinlerinin yetersiz kalması ile de açıklanabilir (35, 36, 39). Laktasyon boyunca koyunlardaki zayıf immunite nedeniyle parazitik hastalıklara yakalanma riski ve verim kaybı artmaktadır. Doğum sonrası koyunlarda hematokrit ve serum albümin konsantrasyonunda ise önemli azalmalar olmaktadır (40).

2.4.3. Haemonchosis'in Türkiye'deki Yayılışı

Türkiye'nin iklim, toprak yapısı ve çevre koşulları nematodların serbest yaşam safhalarının gelişmesi için çok uygun ortamlar olması ve hayvancılığın özellikle koyun sürülerinin mera yönetiminin yanlış yapılması gibi trichostrongylidosis'in yaygın bir şekilde görülmesinin en önemli nedenleri arasında bulunmaktadır (41).

Türkiye'de bu güne kadar koyun ve keçilerde sadece *H. contortus*'un varlığı bildirilmiştir (42). Türkiye'de koyunlarda bulunan mide-barsak ve diğer organlarda görülen helmintler ilk kez Oytun (43), tarafından dışkı muayenesi ile tespit edilmiştir. Türkiye'nin çeşitli

bölgelerinde 1953-1958 yılları arasında yapılan bir çalışmada, 178 enfekte koyunun %42.9'unda *H. contortus* enfeksiyonu tespit edilmiştir (44). Güralp (45), Ankara'da 10 koyun'un nekropsisi sonucu abomazumda %10.99 oranında *H. contortus* saptamıştır. Vural ve ark. (46), Bandırma'da değişik yaş grubundaki 24 baş koyunun nekropsisi sonucu abomazumda %10 oranında *H. contortus* saptamışlardır. Kalkan (47), Diyarbakır ve yöresine ait koyun ve kuzuların post mortem incelemesi sonucu %0.7 oranında *H. contortus* tespit etmiştir. Zeybek (48), Samsun yöresi köylerinde koyunlarda paraziter fauna tespiti için yaptığı araştırmada *H. contortus*'a %53.1 oranında rastlandığını bildirmiştir. Bursa iline bağlı 3 köyde koyunların abomazumlarının post mortem incelenmesi sonucunda *H. contortus*'un yaygın bir şekilde bulunduğu tespit edilmiştir (49). Celep ve ark. (50), Samsun yöresinde her ay 3 ayrı mezbahada kesilen toplam 142 sığır abomazumunu makroskobik olarak incelemeleri sonucunda *H. contortus*'un oranını % 23.9 olarak kaydetmişlerdir. Vuraşener (51), Trakya bölgesinde 12 merkezde 136 kıvırcık koyun dışkısının mikroskobik incelemesi sonucunda incelenen koyunların %32'sinde *H. contortus* türünü tespit etmişlerdir. Vuraşener ve Tüzer (52) Trakya'da yetiştirilen kıvırcık koyunlarda mide-barsak nematod türlerinin belirlenmesi amacıyla nekropsisini yaptıkları koyunların %32'sinin *H. contortus* ile enfekte olduklarını belirlemişlerdir. Çetindağ ve Doğanay (53), Samsun yöresinde mandalarında sindirim sistemi helmintleri üzerine yaptıkları bir çalışmada 100 mandanın dışkı muayenesi ve postmortem incelemesi sonucunda 3'ünün *H. contortus* ile enfekte olduğunu tespit etmişlerdir. Güçlü ve ark. (54), Konya'da 1993-1995 yılları arasında yaptıkları bir çalışmada, nekropsisini yaptıklar 50 koyunun %37.5'inde *H. contortus* türünü saptamışlardır. Çetindağ ve Bıyıkoğlu (55), İç Anadolu bölgesi tiftik keçilerinde mide bağırsak nematodlarının yayılışı tespit etmek amacıyla yaptıkları çalışmada inceledikleri 50 tiftik keçisinde *H. contortus*'un enfeksiyon oranını %12 olarak kaydetmişlerdir. Akkaya (56), İstanbul'da 100 tiftik keçisinin abomazumunu incelemesi sonucunda 5 cinse ait 16 tür identifiye etmiş ve bunun %18'inin *H. contortus* olduğunu tespit etmiştir. Öncel (57), Marmara Bölgesinin güneyinde 30 genç ve 20 erişkin koyunun post mortem incelemesi sonucunda *H. contortus* enfeksiyonunu genç hayvanlarda %37, erişkin hayvanlarda %40 oranında tespit etmiştir. Yıldız ve Aydenizöz (58), Kırıkkale yöresinde dışkı bakısı ile inceledikleri 313 koyunun 207'sinin (%66.13) çeşitli helmint türleri enfekte olduğunu ve en yaygın helmint türünün trichostrongylid (%38.65) olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar aynı zamanda yöredeki koyunlarda yaygın olan Trichostrongylidae türlerini tespit etmek için yaptıkları dışkı kültüründe *Ostertagia, Haemonchus* ve *Nematodirus* sp.'nin yaygın olduğunu saptamışlardır. Tınar ve ark. (59),

Güney Marmara bölgesinde bulunan Karacabey, Bandırma, Tahirova ve Kumkale tarım işletmelerinin her birinden toplanan 50 adet koyun dışkısının larva kültürü sonucunda *Haemonchus* cinsi larvalar görmüşlerdir. Aynı araştırıcılar her ay her işletmeden 5 koyun nekropsisi yapmışlar ve hayvanların %30'unda *H. contortus* tespit etmişlerdir. Gökçen ve Güçlü (60), Konya'nın 3 farklı ilçesinde (Çumra, Beyşehir ve Kadınhanı) 100 sığırın gastrointestinal nematodlarını (GIN) incelemek üzere yaptıkları çalışmada 22 sığırın çeşitli nematodlarla enfekte olduğunu ve bu nematodlardan identifiye edilenlerin 8'inin *H. contortus* olduğunu kaydetmişlerdir. Umur ve Yukarı (61), Burdur yöresi keçilerinde mide-bağırsak nematodları ve mevsimsel aktivitelerini belirlemek amacıyla 50 keçiye ait mide-bağırsak sistemini incelemişlerdir. İncelenen keçilerde *H. contortus*'un prevalansını %12 olarak saptamışlardır. Altaş ve ark. (62), Şanlıurfa yöresindeki koyunlarda bulunan mide-bağırsak nematod türlerini ve mevsimsel dağılımlarını belirlemek amacıyla, Mart 2003-Mart 2004 tarihleri arasında 75 koyuna ait sindirim sistemini incelemişlerdir. İncelenen koyunların 7'sinde (%9.3) *H. contortus* enfeksiyonu saptamışlardır.

Diğer yandan Yıldırım ve ark. (63), Yozgat'ın Boğazlıyan ilçesine bağlı Başhoroz Köyünde gebelik döneminde koyunlarda parazit yükünü monitorize ettikleri çalışmalarında, 30 koyundan aldıkları dışkı örneklerinin mikroskobik incelemesinde *H. contortus*'un enfeksiyon oranını koç katımı öncesinde % 18.3, gebeliğin 1. ayında %17.3, 2. ayında %16.3, 3. ayında %16.0 ve 4. ayında %17.0 olarak rapor etmişlerdir.

Öte yandan ilaç dirençliliği üzerine yapılan sınırlı çalışmalarda; Tınar ve ark. (64), Marmara bölgesindeki 4 çiftlikte mide-bağırsak nematodları ile enfekte çeşitli ırk koyunlar üzerinde yürüttükleri çalışmada oluşturdukları gruplarda albendazol, tiabendazol, tetramizol ve ivermektin dirençliliğini dışkı yumurta sayım testi (FECR) ile araştırmışlar, tedavi sonrası yalnızca bir koyun sürüsünde tiabendazol dirençliliği olduğunu belirlemişler ve larva kültürü sonucunda *H. contortus* ve *T. circumcincta* larvalarının identifiye etmişlerdir. Köse ve ark. (65) Afyonkarahisar yöresinde mide-bağırsak parazitleri ile enfekte koyunlarda albendazol, oksfendazol-oksiklozanid ve ivermektin dirençliliği üzerine FECR ile yaptıkları çalışmada antihelmintik uygulaması öncesi larva kültürüne göre *H. contortus, Oesophagostomum spp., Trichostrongylus spp., Cooperia* spp., *Nematodirus* spp. ve *Ostertagia* spp. larvalarını identifiye etmişlerdir. Araştırıcılar (65) söz konusu anthelmentiklerin uygulanması sonrasında ivermektin grubunda dirençlilik olduğunu belirilemişler, bu grubun tedavi sonrası larva kültüründe *H. contortus* ve *Oesophagostomum* spp.'nin varlığını bildirmişlerdir. Çalışmada

(65), albendazol ve oxfendazol-oksiklozanid gruplarında dirençlilik belirlenmediği kaydedilmiştir.

Öte yandan Türkiye'de mide-bağırsak nematodları üzerine yapılan bazı çalışmalarda; Kırcalı Sevimli ve ark. (66), Afyonkarahisar il merkezinde toplam 985 baş sığıra ait dışkıda yaptıkları larva kültürü sonucunda bunun %25.25'inin *Haemonchus* olduğunu ve 24 baş sığıra ait mide-bağırsak muayenesinde ise *H. contortus* ve *Oesophagostomum venulosum* oranının %20,83 olduğunu; Altaş ve ark. (67), Şanlıurfa yöresi kıl keçilerinde mide-bağırsak nematodları ve bunların yayılışını belirlemek amacıyla 100 keçinin mide ve bağırsaklarını nematodlar yönünden incelemişlerdir. İnceledikleri 100 keçinin 83'ünü (%83) nematodlarla enfekte bulmuşlar ve bunlarda 12 tür nematod saptamışlardır. Keçilerden topladıkları 12 nematod türünün %39.79'unun *H. contortus* olduğunu; Cengiz ve Değer (41), Van Belediyesi mezbahasında kesilen 104 koyunun abomazumunun makroskobik olarak incelemesi sonucu hayvanların %40'ının *H. contortus* ile enfekte olduğunu; Girişgin ve ark. (68), doğal ve entansif olarak beslenerek yetiştirilen 6 aylık 24 baş kıvırcık ırkı kuzuların nekropsisi sonucu 5 kuzunun abomazumunda *H. contortus* (%41.6); Bölükbaş ve ark. (69), Orta Karadeniz bölgesinde 15 karacanın nekropsisi sonucunda *H. contortus*'un prevalansını %53,3 olduğunu; Gökpınar ve Yıldız (70), Kırıkkale Belediye Mezbahası'nda koyunlarda rutin yapılan abomazum muayenesi esnasında makroskobik nodüller görülen 4 koyun abomazumu makroskobik incelemeleri sonucunda erişkin parazit sayısının 27-124 olduğunu saptamışlar ve bu parazitlerin de %96,4'ünün *T.circumcincta* (136 erkek+185 dişi), %3.6'sının ise *H. contortus* (12 dişi) olduğunu belirlemişlerdir.

2.4.4. Haemonchosis'in Dünya'daki Yayılışı

Haemonchus contortus yaşaması için uygun olan tropik ve subtrofik bölgelerde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Parazit sıcak bölgelerde gün geçtikçe artan bir problem olmaktadır (15). Orta Avrupa'da küçük ruminantların %50-75'i *H. contortus* ile enfekte olduğu rapor edilmektedir (71). İran'ın Tahran yöresinde yapılan bir çalışmada 142 koyun abomazumunun post mortem incelenmesi sonucu %49 oranında *H. contortus*'a rastlandığı bildirilmiştir (72). Herd ve ark. (73), ABD'nin Ohio eyaletinde 1977-1978 yılları arasında doğal enfekte kuzularda *Haemonchus, Trichostrongylus, Ostertagia* ve *Nematodirus* türlerinin görüldüğünü ve yaptıkları morfolojik teşhis sonucunda *H. contortus, O. circumcincta* ve *N. filicollis*'in yaygın olarak bulunduğunu belirtmişlerdir. Fakae (74), Doğu Nijerya'da 1987-1988 yıllarında yaptığı bir çalışmada, koyunlarda *H. contortus*'un %87.1 oranında yaygın olduğunu kaydetmiştir.

Fritsche ve ark. (75), Gambia'da 1990-1991 yılları arasında 52 koyun abomazumunu postmortem incelemeleri sonucunda *H.contortus*'un %67 oranında bulunduğunu kaydetmişlerdir. Fakae ve Chiejina (76), 1987-1988 yılları arasında Nijerya'da 12 ay boyunca düzenli periyotlarla inceledikleri koyun ve keçilerde en yaygın bulunan gastrointestinal nematodun *H. contortus* ve *Trichostrongylus colubriformis* olduğunu bildirmişlerdir. El-Azazy (77), Suudi Arabistanın Jeddah bölgesinde 48 koyun abomazumunu post mortem incelemesi sonucu *H. contortus'*un prevalansını %19.8 olarak çok yüksek bir yayılışa sahip olduğunu kaydetmiştir. Chaudary ve ark. (78), Pakistan'ın Potohar bölgesinde 968 koyun dışkısının mikroskobik incelemesinde *H. contortus* yumurtalarına rastlamışlardır. Almalaik ve ark. (79), Sudan'ın South Darfur State'da 79 koyun abomazumunun postmortem incelemesi sonucunda *H. contortus*'un %53.4 oranında bulunduğunu kaydetmişlerdir. Kumsa ve ark. (80), Doğu Ethiopya'nın Ogaden bölgesinde 104 koyun abomazumundan topladıkları toplam 1159 erkek *Haemonchu*s cinsinin morfolojik incelemeleri sonucunda %95.1'inin *H. contortus* %3.5'inin *H. placei* ve %1.5'unun *H. longistipes* olduğunu bildirmişlerdir. Raza ve ark. (81), Multan abattoir'de toplam 2133 koyun abomazumunu post mortem incelemeleri sonucunda *H. contortus* prevalansını %37.18 (793) oranında saptamışlardır. Tasavar (5), Pakistan'ın Khanewal bölgesinde farklı yaş ve ağırlıklarda toplam 333 erkek ve dişi koyun dışkısının mikroskobik incelemesi sonucunda prevalansı erkeklerde %84.6, dişilerde %72.1 ve toplam olarak %77.7 oranında kaydetmişlerdir. Roeber ve ark. (82), Avusturya'da 470 koyun dışkısının mikroskobik incelemesinde %1 oranında saptamışlardır. Musongong (83), Kuzey Nijerya'nın Maiduguri eyaletinde 27 koyun abomazumunu incelemesi sonucu *H. contortus* prevalansını %54 (18) olarak belirlemiştir. Tefera ve ark. (84), South-Western Ethiopya'nın Bedelle eyaletinde 219 koyunun dışkı incelemesinde bu bölgede *Haemonchus* cinsinin prevalansını %67.5 olarak saptamışlardır. Qamar ve Maqbool (85), Pakistan'da 300 koyun kanını serolojik incelemeleri sonucunda koyunların 264'ünün *H. contortus* ile enfekte olduğunu kaydetmişlerdir.

Pakistan'ın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalar sonucunda *H. contortus*'un prevalansı Faisalabad bölgesinde %21.7 (86), Central Punjab'da %72 (87), Swat'da %9.43 (88), Bahawalpur'da %14 (89), Rawalpindi'de %50-76 (90), Faisalabad'ın farklı bölgelerinde ise %68 (91) olarak belirlenmiştir. Jabbar ve ark. (92), Avustralya'nın Melbourne eyaletinde alpaka (*Lama pacos*)'larda *H. contortus* enfeksiyonlarında makrosiklik lakton (closantel ve ivermectin) dirençliliğini incelemişlerdir. Closantel ile tedavi edilen alpakalarda dışkı kültürü sonucu *H. contortus* erginlerinde önemli derecelerde azalmalar olurken, ivermektin ile tedavi

edilen alpakalarda dışkı kültürlerinde *H. contortus* sayısında azalmaların olmadığı dikkat çekmiştir.

2.5. PATOGENEZ

Haemonchosis'in patogenezinde çeşitli faktörler rol oynamaktadır. Hastalığın gelişimi açısından, parazitin virulansı, konağın genetik yapısı, yaşı, ırkı, konağın immun yanıtı ve stres önemli faktörler arasında bulunmaktadır. *H. contortus*'un ana patojenik mekanizması mide mukozası üzerindeki direkt lezyonların görülmesi ile olmaktadır. Enfekte ruminantlarda konak-parazit gelişimi boyunca immun sistem yanıtları, özellikle abomazumda morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere neden olmaktadır. Aynı zamanda bazı kan parametrelerinde değişiklikler gözlenmekte ve bu durum hem anemik duruma hem de sindirim-emilim sendromlarının bozulmasına neden olmaktadır (11) .

Saha ve deneysel çalışmalar ile abomazum nematodlarının konak üzerindeki morfolojik ve fiziksel etkileri incelenmiştir. Konak üzerindeki etkileri, nodul oluşumu (Şekil 2.3), mukoz hücre hiperplazı, süperfisyal epitel zararları, asit salınımını azaltan, serum gastrin ve pepsinojen konsantrasyonunu artıran doku tamiridir (13). Parazitli abomazumlarda, mide bezlerindeki larvalardan dolayı mide disfonksiyonu ve süperfisyal epiteller zarar görmektedir. Mukoza üzerinde bulunan ergin parazitlerin hareketleri, parazit ve kimyasalların geçişine izin verirken difüzyonu engellemektedir. Abomazum hipoasiditesi, pepsinojen aktivasyonunu azaltmakta ve aynı zamanda enfeksiyonun başlangıç safhalarında gastrin salgılanması için gerekli olmaktadır. Artan serum pepsinojen konsantrasyonu mukoza boyunca pepsinojenin geri difizyonundaki artışa bağlanmaktadır (93).

H. contortus'un erginleri günde 0.05 ml kan emmektedir (94). Toplam hücre hacmindeki (PCV) azalma ile birlikte belirgin bir şekilde kan kaybı görülmektedir. Bu parametreler, parazitin virulansında marker olarak (95, 96) ve haemonchosis'de parazit yükünün dolaylı olarak belirlenmesinde kullanılmaktadır (97, 98). PCV'deki azalma, mukozadan L4'lerin çıkışına rastlayan enfeksiyondan sonraki 4 gün içinde görünür hale gelmektedir. Genç ve ergin parazitlerin kan emme isteğindeki kombine etki, parazitlerin ağız boşluğunda iyi gelişmiş lansetlerin bulunması ve enfeksiyon bağımlı hemorojik gastritisin neden olduğu mide-bağırsaktaki kan kaybından dolayı PCV'deki azalma patent periyodun (enfeksiyondan sonraki 3. hafta) başlaması ile hızlanmaktadır (94, 99, 100). Minumum değerlere ise enfeksiyonun 7. haftasında ulaşılmaktadır (101).



Şekil 2.3. *H. contortus* ile enfekte koyunların abomazum mukozasında oluşan nodüller

(**Kaynak:** Terefe ve ark, 2009: 13)

PCV değerindeki azalma, hemoglobin konsatrasyonundaki (5.3-7.7 mg/dL) azalma ile aynı zamana denk gelmektedir. Bu durum parazitlerin salgıladığı hemolitik faktörlerin neden olduğu eritrositlerin lizis olması (102, 103) ve parazitin kan emme isteğinin artmasına bağlı olarak bağırsaklarda kan kaybı artışına neden olmaktadır (94).

H. contortus ile ağır enfekte koyunlarda anemi 3 evrede gelişmektedir.

Birinci evre: Enfeksiyondan sonraki 7-25. günler arasında olmaktadır. Bu dönemde serum demir düzeyi aynı kalırken toplam hücre hacmi hızla %33'den %22'ye düşmektedir. Toplam hücre hacmindeki hızlı düşüş, kanama ile oluşan kan kaybını telafi etmek için konağın eritropoiteik sisteminin aktive olması ve kan kaybı arasındaki zamanın uyumsuzluğundan kaynaklanmaktadır (2).

İkinci evre: Enfeksiyondan sonraki 6-14. haftalar arasında olmaktadır. Toplam hücre hacmi normal seviyeden düşük ancak sabittir. Bunun nedeni oluşan kan kaybına rağmen eritropoiteik sistem tarafından üretilen eritrositler ile kan kaybının karşılanmasıdır. Bu dönemde plazma demir düzeyinde ve dışkıda demir kaybında artışlar gözlenmektedir. Şiddetli kanamalarda demir emilimi en yüksek seviyede olmasına rağmen, koyunlarda bağırsaklardan demir emilimi sınırlı kapasiteye (bağırsaklardaki demirin yalnızca %11'i emilmektedir) sahiptir. Demir rezervlerinde ciddi azalmalar olmakta birlikte, kemik iliği ve serumdaki demir azalmaları ise aneminin 3. evresini göstermektedir (2).

Üçüncü evre: Bu evre demir eksikliği nedeni ile hemopoiteik sistemin displazi olmasından kaynaklanan toplam hücre hacmindeki hızlı düşüş ile karakterizedir (2).

Enfekte hayvanlarda mide kanaması, kan kaybı, mukoza geçirgenliğinin artışı ve hücre içi yapının bozulmasının bir sonucu olarak mide lümenine proteinlerin geçmesi, epitel hücre kayıpları, doku tamiri, mukus üretiminde artma ve immun sistemin protein sentez isteğinin artmasından dolayı plazma protein konsatrasyonunda önemli azalmalar olmaktadır (94,104, 105). *H. contortus* ile enfekte hayvanlarda serum proteinlerinin büyük bir kısmı dışkı ile dışarı atılmakta ve böylece günlük 210-340 ml plazma kaybı olmaktadır. Enfekte hayvanlarda anemi, mideye besin geçişinin azalması, sindirim sisteminin bozulması, pepsin sentezini önleyen abomazum PH'sının artması, amino asit ve küçük peptitlerin absorbsiyonundaki azalma nedeni ile beslenme miktarlarında önemli azalmalar olmaktadır (2, 100,106, 107).

Abomazumdaki PH artışı, mide mukozasının parietal hücrelerinin sentezlediği hidroklorik asit üretimi ve salgılanmasındaki azalmadan kaynaklanmaktadır. Abomazumda bulunan parazitler ortama amonyum gibi bazı maddeler salmaktadır. Amonyum, pepsin veya mide bezlerinin hareketini önleyerek parazitin etrafındaki PH değerini artırmakta ve böylece mide bezlerinin ana hücrelerinin ürettiği pepsinojenin pepsine dönüşümünü engellemektedir. Pepsinojen bu bezlerde birikmekte, daha sonra salınmakta ve kana geçmektedir (31, 93, 96). Parazitlerin salgı-boşaltım ürünleri, asetil kolin, histamin, epitel büyüme faktörü ve gastrin gibi bazı maddelerin serbest kalmasını uyarmaktadır. *H. contortus* ile enfekte koyun ve keçilerde deneysel çalışmalarda serum pepsinojen değerinin enfeksiyonun 4-14. günlerinde artış gösterdiği belirlenmiştir (108, 109).

2.6. KONAK İMMUN YAPISI

Haemonchosis'de konağın immun yanıtı hastalık sebebi patojenlere etkili bir şekilde yanıt verebilen oldukça karmaşık bir sistemdir. İmmun sistem yanıtı genellikle doğal ve kazanılmış bağışıklığın etkileşimi sonucunda olmaktadır (11, 13).

Koyunlarda mide-bağırsak enfeksiyonlarına karşı oluşan immunite oldukça karmaşık bir mekanizmaya sahiptir ve türler arasında farklılık göstermektedir. Genellikle yerli koyun ırkları kültür ırklarına, keçiler koyunlara göre daha dirençlidir. Mide-bağırsak nematodlarına karşı koyunlar, doğuştan herhangi bir dirence sahip değildir. Bu nedenle özellikle genç hayvanlarda mide-bağırsak enfeksiyonlarına maruz kalma hastalığın yaygın ve öldürücü seyretmesine neden olmaktadır. Parazitlere maruz kalmak enfeksiyona karşı bir direncin şekillenmesini sağlamaktadır. Yaş, cinsiyet, ırk, stres, genetik yapı, gebelik, doğum ve laktasyon gibi faktörler immuniteyi farklı şekillerde etkilemektedir (2, 110,111).

Haemonchus enfeksiyonlarında görülen self kür mekanizması helmintlerde iyi bilinen immünolojik bir olaydır. Bu olayda, hayvanın taşıdığı parazitlerin büyük bir kısmı herhangi

bir kimyasal müdahale olmaksızın kendiliğinden atılmaktadır. Duyarlı hayvana enfeksiyon için yeterli dozda L3 verildiği zaman bunların konağın immun sistemini uyardığı ve larvaların gömlek değiştirip L4 haline dönüşünceye kadar geçen sürede yeterli immuniteye ulaşıldığı ve bunların atıldığı sanılmaktadır. Self kür olayı genellikle koyunlarda görülmekte ve oluşması için belli aralıklarla larva alınması ve 6-8 haftalık bir sürenin geçmesi gerekmektedir. Self kür olayına kanda histamin, komplement bağlayıcı antikor ve abomazumdaki mukozal ödem artışı katılmaktadır (2).

Self kür olayında konak ve parazitin genetik faktörleride rol oynamaktadır. *H. contortus* enfeksiyonlarına karşı konağın reaksiyonunda laktasyonun çok önemli bir etkisi vardır. Doğum sırası (periparturient) immunitedeki gevşeme yeni enfeksiyonların oluşumuna zemin hazırladığı gibi, inhibe larvaların aktivasyonuna, genç parazitlerin erginleşmesine ve dölleme yeteneklerinin artmasına neden olmaktadır. Bu şekilde hayvanlar dışkılarıyla fazla miktarda yumurta çıkararak meranın enfekte olmasına ve meraya gelen hayvanların enfeksiyonuna sebep olmaktadır. İmmunitedeki bu gevşeme, hormonal değişikliklere özellikle laktojenik hormon olan prolaktine bağlıdır. Aynı zamanda antijen ve fitomitojen, perifer kandaki lenfosit blastogenezisini etkiler, bu da gebeliğin son dönemi ile laktasyonun başlangıcında dışkıdaki yumurta sayısının artışına neden olur (15).

Mide-bağırsak nematod enfeksiyonlarına karşı oluşan immun yanıt genellikle Th2 yanıt şeklindedir. Koruyucu immun yanıtın oluşması ve immun yanıtın Th2'ye dönüşmesi de CD4+ yardımcı T hücrelerinin aktivasyonuna bağlıdır. Th1 immun yanıt genellikle enfeksiyona duyarlılığı artırır. Th2 immun yanıtında hayvanın daha önce enfeksiyon geçirip geçirmemesi dişi parazitlerin yumurta üretimini etkilemektedir. *H. contortus* ile doğal veya deneysel enfekte koyunlar üzerine yapılan çalışmalarda mukoza ve bölgesel lenf nodüllerinde CD4, CD8, gamma delta, B lenfositler, eozinofiller ve mastositlerde artışlar gözlenmiştir. Aynı zamanda enfeksiyon boyunca immunoglobulinlerden IgE, IgG ve IgA'da da artışlar olduğu kaydedilmiştir (11). Lacroux ve ark. (7), 3 aylık kuzuları 10.000 *H. contortus* L3'ü ile bir ve iki kez enfekte ederek primer ve reenfeksiyon denemesi yapmışlardır. Abomazum mukozası ve lenf yumrularında Th2 immun yanıtın oluştuğunu gözlemlemişler ve IL-4 ve IL-13'ün çok sayıda oluştuğunu ayrıca eozinofil, mast hücreleri, globül lökosit ve spesifik IgG ile mukozal IgA'nın fazla miktarda üretildiğini tespit etmişlerdir.

Birçok mide-bağırsak nematodlarında olduğu gibi, *H. contortus*'un sekonder enfeksiyonlarında larvaların hızla atılmasında mukozal mast hücreleri ve özellikle intraepitelyal mast hücreleri (globül lökositler) önemli rol oynamaktadır. Mukozada bu

hücrelerin varlığı tip 1 aşırı duyarlılık reaksiyonuyla sonuçlanır. Ancak parazitlerin gecikmiş veya sonradan atılma mekanizması ise hala tam olarak anlaşılamamıştır (110).

2.7. AŞI GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI

Son yıllarda *H. contortus*'un antihelmintiklere direnç göstermesi nedeni ile haemonchosis'e karşı aşı geliştirme çalışmaları hız kazanmıştır. Bu amaçla parazitlerin kendisi, bazı organları ve çeşitli molekülleri araştırılmıştır (112). İlk çalışmalar parazit antijenlerini karakterize eden iradiye larvalar ile başlamış daha sonra *H. contortus*'un bağırsak villuslarından izole edilen proteinler (Contortin), membran (H11) ve kutikulası, enfektif larva kutikulası, galaktoz içeren glikoprotein kompleksi (H-gal GP), somatik antijenler (p26/23) ve sekretör (S)-ekstretör (E) ürünleri kullanılmış olup (107), günümüzde ise *Escherichia coli*'de ifade edilen rekombinant proteinler ve genomik çalışmalarla aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir (113).

Parazitlerde çeşitli antijenler bulunmakla birlikte özellikle mide-bağırsak nematodunda biri açık diğeri gizli olmak üzere 2 tip antijen vardır. Gizli antijenler, doğal enfeksiyonlarda ortaya çıkmaz ve bunlara karşı immunite oluşmaz. Açık antijenler ise doğal enfeksiyonlarda görülen E/S antijenleri ile yüzey antijenleridir. Antijenik karakter gösteren protein sayısı ve molekül ağırlıkları parazit türüne göre değişir. *H. contortus*'ta en immun dominant kısım 91.2 kDa'luk protein olmakla birlikte, molekül ağırlığı 28.2-144.5 arasında değişen 11 immun dominant protein saptanmıştır (114). Gizli antijenler özellikle kan emen parazitlerde çok etkili, diğerlerinde etkisizdirler. Açık antijenler ise hem kan emen hem de diğer parazitlerde etkilidir (115).

İradiye larvalar: Bu aşılamada radyasyonla (iradiye larva) L3'lerin azaltılması amaçlanmıştır. Koyunlarda iradiye larvalar ile yapılan aşılamalarda deneysel şartlar altında *H. contortus* ve *T. colubriformis*'e karşı başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, bu başarı daha sonraları saha koşullarında özellikle genç hayvanlarda tekrarlanamamış ve böylece iradiye larva aşı çalışmaları terkedilmiştir (116).

Ergin 15/24 kDa'luk ES antijenleri: Moleküler ağırlığı 15 ve 24 kDa olan *H.contortus* ekstretör-sekretör ürünleri hayvanlarda aşılama amacıyla kullanılmış ve %70'den fazla bir koruma sağlamıştır. Bu antijenler zenginleştirilip koyunlara verildiğinde parazit yükünü %64-85, dışkıda yumurta çıkarımını ise %32-77 oranında azalttığı tespit edilmiştir (117).

H11: H11, *H. contortus*'un en iyi bilinen gizli antijenlerinden birisidir. Bu antijen aminopeptidaz A ve M aktivitesine sahip 110 kDa'luk bir membran glikoprotein kompleksi olup, *H. contortus* yanında *T. circumcincta* ve *O. ostertagia*'da bulunmaktadır. Antijen parazitin yalnızca bağırsak villuslarında bulunur ve parazit tarafından alınan kanın

sindiriminde rol almaktadır. Böylece antikorlar bu enzime bağlanınca parazitin kan emen L4 ve erginleri beslenemez, bu şekilde antikor titresine bağlı olarak koruma sağlamaktadır (118, 119). H11 antijeni ile yapılan aşılamada parazit yükünü %75, dışkıda yumurta atılımını %90 azalttığı görülmüştür (120).

Contortin: Nematod bağırsaklarının mikrovillusları arasındaki boşluğu dolduran heliks şeklinde bir proteindir. Bu antijen L4 ve ergin parazitlerin bağırsak hücrelerinin yüzeyinde bulunmaktadır. Contortin ile yapılan aşı çalışmalarında kuzularda *H. contortus*'a karşı %78'lik bir koruma sağlanmıştır (121).

H-gal-GP (Haemonchus galaktozu içeren glikoprotein kompleksi): *H. contortus*'a karşı yüksek bir koruma sağlayan diğer bir gizli antijen, parazitin bağırsak hücrelerinden izole edilen H-gal-GP'dir. Bu protein ile yapılan aşılama çalışmalarında parazit yükünde %60, dışkıda yumurta atılımında %80'lik bir azalma sağlamıştır (120). ABD'de yapılan çalışmalarda hem H11 hem de H-gal-GP antijeninin oğlak ve kuzularda parazit yükü, dışkıda yumurta atılımı, toplam hücre hacmi ve IgG üretiminde yüksek oranlarda koruma sağladığı bildirilmiştir (122, 123).

Hc-sL3: Kılıfsız L3'lerin yüzeyinden elde edilen ve 70-83 kDa ağırlıkta olan antijen Hc-sL3 yüzey antijeni olarak isimlendirilmiştir. *H. contortus*'a immun duyarlı hayvanların abomazum lenf yumrularından izole edilen antikor salgılayan hücrelerden (AbSC) bu antijene spesifik antikorlar elde edilmiştir (119). Doğal Hc-SL3 antijeni ile yapılan aşılamada dışkıdaki yumurta sayısını %64-69, parazit yükünü %45-55 azalttığı saptanmıştır (124).

Somatik antijenler: Ergin *H. contortus*'tan eriyebilir özellikte ve düşük moleküler ağırlıkta 3 peptit elde edilmiştir. Bu peptitler F4 (56 kDa), F8 (39 kDa) ve F14 (18.5 kDa) olarak isimlendirilmiştir. Bu peptitlerle koyunlarda aşılamalar yapılmış, F8 ile aşılanan kuzularda *H. contortus*'un prepatent süresi uzamış, dışkıdaki yumurta sayısı ve abomazumdaki parazit yükü %40 azalmıştır (112).

Sistein proteazlar: Ergin parazitlerin bağırsak hücrelerinin mikrovilluslarının yüzeyinde bulunan ve bağırsak membran sistein protezlar (TSBP) için zenginleştirilen deterjan ekstraklarıdır. Sistein proteazlar ile yapılan aşılamada parazit yükü % 47, dışkıda yumurta atılımı %77 azalmaktadır. TSBP bakteride ifade edilince memeli Cathepsin B'ye benzer olduğu görülmüştür (118). TSBP'nin 60 kDa'luk büyük fraksiyonu glutamate dehidrogenaz (GDH) olduğu gösterilmiş ve bu protein *H. contortus*'un bağırsak hücrelerinin sitoplazmasında ifade edilmiş, ancak koruyucu bulunmamıştır (125, 126).

Bütün bu çalışmalara rağmen şu an piyasada hiçbir ticari aşı bulunmamaktadır. Bu durum *H. contortus*'a karşı koruyucu olan proteinlerin rekombinant olarak üretilememesi, helmintlerin doğal immunite mekanizmasının tam olarak bilinmemesi ve ergin parazitlerden doğal antijenlerin ekstrakte edilmesinin pahalı olmasından kaynaklanmaktadır (18).

2.8. HAEMONCHOSİS'TE TANI

Genel olarak tüm hastalıklarda olduğu gibi haemonchosisde de hastalığı tedavi edebilmek ve bu hastalıktan korunma yöntemlerini geliştirebilmek için öncelikle bu hastalığın tanısının yapılması gerekmektedir. Bu amaçla tanı; klinik ve nekropsi bulguları, dışkı muayene yöntemleri, serolojik ve moleküler yöntemlerle yapılmaktadır (127, 128).

2.8.1. Klinik ve Nekropsi Bulguları

Hastalık, genellikle duyarlı ve genç hayvanların yoğun olarak bulunduğu meralarda ortaya çıkmaktadır. Haemonchosis'de klinik belirtiler hiperakut, akut ve kronik olmak üzere 3 formda görülmektedir (2).

Hiperakut Haemonchosis: Hastalığın bu formu çok yaygın değildir ve yalnızca oldukça duyarlı hayvanlarda görülmektedir. Ağır enfeksiyonlarda klinik belirti görülmeksizin 1 hafta içinde hayvanlarda ani ölümler olmaktadır. Bu durum genellikle hayvan 10.000'den fazla parazit ile enfekte olduğu durumlarda ortaya çıkmaktadır. Parazit sayısının çok olmasından dolayı anemi şekillenir, dışkı kandan dolayı kırmızı-siyah renk alır ve aşırı kan kaybı nedeniyle ani ölümler görülmektedir. Şiddetli hemorajik gastritis vardır ve ağır enfeksiyonlarda prepatent periyot sonunda ölümler ortaya çıkmaktadır (2, 13).

Akut Haemonchosis: Akut haemonchosis, genç ve duyarlı hayvanların ağır enfeksiyonlara yakalanmasıyla ortaya çıkmaktadır. Akut haemonchosis'in klinik belirtileri anemi, değişik derecelerde ödem, uyuşukluk, koyu renkli dışkı ve yapağı kırıklığıdır (Şekil 2.4-Şekil 2.5). Anemi, hipoproteinemi ve ödem (çene altı şişliği) ile birlikte olmakta ve enfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde anemiye bağlı olarak ölümler görülmektedir (129). Gram dışkıdaki yumurta sayısı 100.000'den fazladır. Abomazumda 1000-10.000 erişkin parazit bulunmakta, kaslarda ödem ve anemi şekillenmektedir. Anemi hızla gelişmekte ve buna bağlı olarak kemik iliğinde eritropoetik yanıt şekillenmektedir (2, 13, 25).



Şekil 2.4. Haemonchosis'de çene altı ödemi (**Kaynak:** Scot, 2010: 129)



Şekil 2.5. Haemonchosis'de anemi (**Kaynak:** Scot, 2010: 129)

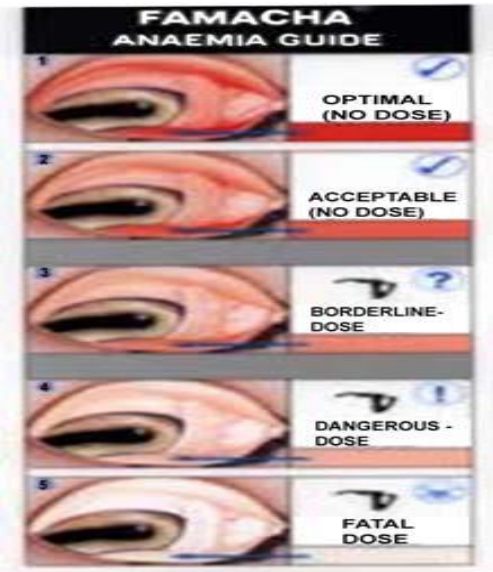
Kronik Haemonchosis: Kronik haemonchosis, son derece yaygın ve ekonomik önemi fazla olan bir enfeksiyondur. Bu enfeksiyon parazit sayısının düşük (100-1000) olduğu durumlarda ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyona bağlı olarak hayvanlarda kilo kaybı ve halsizlik görülmektedir (2, 12, 71, 130). Morbidite %100, mortalite ise çok düşüktür. Anemi ve hipoproteinemi, hayvanların beslenme, eritropoietik sistemin durumu ve demir rezervlerine bağlı olarak hafif veya şiddetli olmaktadır (2, 131). Ergin parazitler, kalsiyum ve calretikulin olarak bilinen pıhtılaşmayı önleyici bir protein (kontortin) üreterek konak üzerinde kolaylıkla beslenmekte ve bulunduğu yerde kanamalı lezyonlara sebep olmaktadır (132). Gram dışkıdaki

yumurta sayısı 2000'den azdır. Post mortem incelemede, kemik iliğinde kronik genişleme ve hiperplazik gastritis görülmektedir (2).

Haemonchus contortus ile enfekte ruminantlarda iştahsızlık, letarji, kilo kaybı, süt ve yün üretiminde azalma, mukozanın soluk renkli olması, ödem (çene altı şişliği), toplam hücre hacminde, hemoglobin ve plazma proteinlerinde azalma, serum pepsinojen, mide ve perifer kan dolaşımında bulunan eozinofil sayısında artışlar gözlenmektedir. Hastalığın son safhalarında zayıflama ve buna bağlı olarak da ölümler görülmektedir (11, 101, 133, 134).

Koyunlarda parazitik enfeksiyonların sebep olduğu aneminin derecesini belirlemek için görsel bir kolorimetrik uygulama geliştirilmiştir (13). Kan, sıvı kısım ve plazma olmak üzere 2 kısımdan oluşmaktadır. Kırmızı kan hücrelerinin plazmaya oranı hayvanların sağlıklı ve sağlıksız olduğu hakkında bilgi vermektedir. Teorik ve deneysel çalışmalar ile göz mukoz membranlarının rengi değerlendirilerek bu oran belirlenmektedir. *Haemonchus* ile enfekte ve yoğun parazit yükü bulunan hayvanlarda plazmanın kan hücrelerine oranının düşük olduğu belirlenmiştir. Böylece gözün mukoz membranı soluk renkte görülmekte ve bu durum anemi olarak bilinmektedir (135).

FAMACHA©, koyunlarda göz mukoz membranlarında anemiye bağlı renk değişimlerinin belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem güney yarımkürede artan entegre parazit kontrol yöntemlerinden biri olarak kullanılmaktadır. Koyun veya keçilerin alt göz kapağının iç yüz rengi incelenerek aneminin derecesi belirlenebilmektedir. Koyunların göz mukoz membranındaki anemiye bağlı renk değişimlerinin karşılaştırılması için, beş farklı kategoriye ayrılan bir kart üretilmiştir. Bu kartta koyunların alt göz kapağının iç yüz rengi 1 (kırmızı, anemik değil), 2 (kırmızı-pembe, anemik değil), 3 (pembe, yarı anemik), 4 (pembe-beyaz, anemik) ve 5 (beyaz, şiddetli anemik) olmak üzere 5 kategoriye ayrılmıştır (Şekil 2.6) (136). Doğal bir ışıkta koyunların göz kapakları açıldıktan sonra, özellikle alt göz kapağının iç yüzündeki renk değişimi, bu karttaki renklerle karşılaştırılarak, koyunların kategori yönünden hangi kategoriye girdikleri belirlenir. Kategori 4 ve 5'tekilere mutlaka tedavi uygulanması gerekmektedir.



Şekil 2.6. FAMACHA© göz rengi kartı (**Kaynak:** Bath ve Van Wyk, 2001: 136)

Nekropsi bulguları, haemonchosis'in klinik belirtilerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Nekropside kan sulu iken mukoz membranlar ve deri soluk renklidir. İç organlar da genellikle soluk renklidir. Göğüs boşluğunda, perikard ve karında su toplanması belirgindir ve yoğun bir kaşeksi vardır. Yağ dokuları bozularak jelatinöz bir dokuya dönüşmüştür. Karaciğer açık kahverenklidir ve kolayca parçalanır (2, 13). Vücut boşluğunda ödem, lokal lenf nodüllerinde hipertrofi, peteşiyel kanamalar ile abomazum mukozasında ödem görülmektedir. Abomazum kırmızımsı-kahverenkli bir sıvı içerir ve karkas sıcaksa hareketli olan parazitler görülebilmektedir. Mukoza şişkin ve parazitlerin küçük kırmızı tutunma yerleri ile kaplıdır. Bazen ülserler görülebilmektedir. Bağırsaklarda dışarı atılan çok az sayıda parazit bulunabilmektedir (137, 138).

2.8.2. Dışkı Bakısı Yöntemleri

Strongil nematod enfeksiyonlarının antemortem olarak tanısı, flotasyon (Mc Master sayımı), Baerrman tekniği veya larva kültürü metodları kullanılarak dışkıda nematod larvalarının belirlenmesi ve yumurta sayımı esasına dayanmaktadır (139, 140). Ergin dişiler farklı üreme şekillerine sahip olduklarından gram dışkıdaki yumurta sayısı mide barsaktaki ergin nematod sayısı hakkında bize net bir bilgi vermemektedir. Bu durum özellikle *Trichostrongylus* gibi düşük üreme potansiyeline sahip nematodlarda görülmektedir. Ancak oldukça üretken olan bazı türlerde (*H. contortus, Oesophagostomum venulosum* ve *Chabertia ovina*) gram dışkıdaki yumurta sayısı (EPG değeri) ve bağırsaktaki ergin nematod sayısı arasında bir ilişki bulunmaktadır (139). *H. contortus, Trichostrongylus axei, Teladorsagia/Ostertagia spp*. ve

Nematodirus spp. gibi ruminantların bazı strongylidlerinde çevre şartları uygun olmadığı zamanlarda larvalar hipobiyoza girerler ve böylece ergin dişiler tarafından yumurta üretilmez. Çevre şartları uygun hale geldikten sonra yumurtalar dışkı ile atılırlar (141).

Strongil nematodların identifikasyonları, morfolojik karakterizasyonlarına, konak türlerine, konak ve çevredeki patolojik etkilerine göre yapılmaktadır. Ancak spesifik tür teşhisi bu kriterlere göre yapılamamaktadır. Birçok strongil nematod yumurtasının şekli, büyüklüğü ve yapısı birbirine benzemektedir (140, 142-144). Özellikle çeşitli cins ve türlerin yumurtalarının sayısal olarak ölçümlerinde benzer yakınlıklar bulunmaktadır (144). Cins düzeyinde ayrım yapabilmek için, larva kültürü yöntemi kullanılarak dışkıda yumurtalardan 3. dönem larvaların gelişmesi sağlanmaktadır (139). Bu yöntem, zaman alıcı olması (ortam koşullarına bağlı olarak L3'lerin gelişmesi için 1-2 haftayı bulmaktadır) ve L3'leri identifiye etmek için deneyimli bir elemanın bulunması nedeniyle sınırlı kullanım alanına sahiptir (145).

2.8.3. Serolojik Yöntemler

Koyunlarda *H. contortus'un* neden olduğu enfeksiyonların spesifik teşhisinde çeşitli serolojik ve immünolojik (kopro antijen belirleme) yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler içerisinde enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dot-ELISA, hemagglutination (HA) ve complement fixation (CF) testleri bulunmaktadır (146-148). ELISA testi, parazitlere karşı serum antikorlarının ve çok sayıda örneğin aynı zamanda belirlenmesini sağlayan hızlı ve basit bir testtir. Test aynı zamanda geniş hayvan gruplarında seroepidemiyolojik çalışmalarda güvenilir bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tür testler dışkı inceleme yöntemlerine göre daha az zaman almaktadır. *H. contortus*'un tanısında parazitin E/S (excretory/secretory) antijenleri kullanılarak ELISA testi yapılmıştır (149). Alunda ve ark (112) ergin *H. contortus*'tan moleküler ağırlığı 56 (F4), 39 (F8) ve 18.5 kDa (F14) olan 3 peptit izole ederek 4-4.5 aylık kuzularda nematodlara karşı aşı çalışmalarında kullanmışlardır. Daha sonra immunitenin oluşmasını sağlayan antikorları ELISA testi ile incelemişlerdir. Dot-ELISA testinde, saf veya saflaştırılmış ES antijenleri kullanılmaktadır. ES antijenleri, koruma ve teşhis için güçlü antijen olduklarından prepatent periyot boyunca haemonchosis'in erken tanısında, fazla zaman almayan, kolay uygulanan ve basit bir test olan dot-ELISA testinde kullanılmaktadır (149). Prasad ve ark. (150), *H. contortus* E/S (excretory/secretory) proteinlerini saflaştırarak *H. contortus* ile enfekte koyunların doğal veya deneysel serumlarında Dot-ELISA yöntemini kullanmışlar ve haemonhosis'in erken tanısında ES antijenlerinin kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Lone ve ark. (148), ELISA yöntemi ile ergin *H. contortus* antijenlerini kullanarak koyunlarda haemonchosis'in immonolojik yöntemlerle tanı etkinliğini

araştırmışlardır. Araştırıcılar ELISA testinin sensitivitesini %80, spesifikliğini ise %21.42 olarak belirlemişler ve yöntemin klinik durumlarda ve erken teşhiste oldukça sensitif olduğunu ancak özgül olmadığını belirtmişlerdir. Buna karşın kullanılan serolojik tanı testlerinin, parazitin antijenleri ile çapraz reaksiyon vermesi durumunda testin özgünlüğünün azaldığıbildirilmiştir. Serolojik testlerin diğer bir dezavantajı ise yeni ve daha önce geçirilmiş enfeksiyonları ayırt edememektedir (151, 152).

2.8.4. Moleküler Yöntemler

Hastalık etkenlerinin teşhisinde gerek mikroskobik gerekse serolojik yöntemlerde karşılaşılan olumsuzluklar nedeniyle son zamanlarda parazitin DNA veya RNA'sının varlığını ortaya koymaya yarayan PCR (Polymerase Chain Reaction), Multiplex PCR, Nested PCR, Reverse Transcriptase PCR, Real-Time PCR, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) PCR gibi moleküler tabanlı teknikler kullanılmaya başlanmıştır (153). Enfeksiyonun spesifik teşhisi veya parazitlerin identifikasyonu için kullanılan PCR tabanlı testlerde bir veya daha fazla hedef DNA bölgesi belirlenebilmektedir. Bu yöntem, hedef organizmanın genomundaki, özgül bir DNA dizilimini, tekrarlayan şekillerde, binlerce kez çoğaltarak, kolaylıkla tespit edilebilir hale getirmektedir. Spesifik identifikasyon için hedef DNA bölgesi popülasyon içindeki küçük bir farklılığı bile ortaya koyabilmelidir. Bu amaçla parazitlerin tür veya suş ayrımını yapacak çeşitli ribozomal (internal transcribed spacers (ITS-1 ve ITS-2),18S, 5.8S, 28S rRNA) ve mitokondriyal gen bölgeleri (NAD4, COI) üzerinde çalışılmıştır (127, 153).

Moleküler tabanlı yöntemlerden olan real-time PCR'ın, 1990'ların başında gelişmesiyle birlikte PCR amplifikasyonu görünür hale gelmiştir. Real time PCR sistemi, floresan işaretli boya ve problar kullanılarak PCR çoğaltımını görünür hale getirmekte ve monitorize edebilmekte ve aynı zamanda birden fazla paraziti kantitatif olarak eş zamanlı tespit etmesiyle oldukça spesifik bilgiler sağlamaktadır (154, 155). Yöntemin biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmakla birlikte tek nokta mutasyonlarını belirleme, hastalık etkeni patojenleri ve DNA hasarını belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi (single nucleotid polymorphism), kromozom bozukluklarının tespiti gibi birçok çalışmalarda da kullanım alanları bulunmaktadır (156).

Real time PCR tekniği küçük ruminantlarda trichostrongil nematod enfeksiyonlarının teşhisinde mikroskobik ve serolojik yöntemlerdeki sınırlamaların hızla önüne geçerek hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle son yıllarda öne çıkan

tekniklerin başında gelmektedir. Ayrıca söz konusu teknik ile mutasyon analizleri ve gen ekspresyonları da hassas bir şekilde belirlenebilmektedir (147,157).

Her tanı yönteminin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Doğrudan etkeni görmeye yönelik yapılan mikroskobik muayenenin; basit olması, bazı parazit yumurtalarının morfolojik olarak ayrımlarının yapılabilmesi gibi avantajlarının yanında; çok zaman alması, ekonomik olarak külfetli ve yorucu olması, yanlış yorumlara neden olması, bazı trichostrongil nematod yumurtalarının morfolojik olarak birbirine benzer olmasından dolayı ayrım yapılamaması ve deneyimli personel gereksinimi gibi dezavantajları da mevcuttur (158, 159). Parazit hastalıklarının etkenleri direkt olarak görülemediği veya görülmesi zor olduğu zamanlarda bu hastalıkların tanısının yapılmasında kullanılan serolojik yöntemlerin de çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Basit ve hızlı olması, otomasyona olanak vermesi, çok sayıda örneğin eş zamanlı olarak teşhis edilebilmesi avantajlarından olup; özgüllüğünün düşük olması, atlatılmış veya latent enfeksiyonları ayırt edememesi, parazitler arasında çapraz reaksiyonlar vermesi ise dezavantajları arasında bulunmaktadır (160, 161).

Bu yöntemlere alternatif olarak geliştirilen nükleik asit tabanlı moleküler teknikler ile immun sistemden bağımsız veya atlatılmış enfeksiyonlardan etkilenmeksizin konak vücudunda çok az miktarda etken olsa dahi direkt hastalığa neden olan türlerin teşhisleri yapılabilmektedir. Bu moleküler yöntemlerle hastalığa neden olan parazit türlerinin eş zamanlı olarak teşhisleri de yapılabilmektedir. Moleküler yöntemlerinde kendisine özgü çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemler ekonomik olarak pahalı ve çok aşamalı yöntemler olup, inhibitörleri nedeniyle yanlış negatiflikler verebilmekte ve kontaminasyona bağlı olarak yanlış pozitiflikler de gösterebilmektedir (161, 162).

2.9. TEDAVİ

Nematod enfeksiyonlarının tedavisinin temelinde günümüzde antihelmintik kullanımı gelmektedir. Ancak bundan 200 yıl önce tedavi için çeşitli kimyasal maddeler denenmiştir (163). Haemonchosis'in ilk tedavisinde arsenik ve terebentin kullanılmıştır. Ancak zamanla bu maddeler hayvanlarda toksik etki yaptığından dolayı yeni tedavi şekilleri geliştirilmiştir. Tedavinin ilk ve etkili biçimlerinden biri hayvanlara oral yolla bakır sülfatın verilmesidir. Bakır sülfat uygulaması, 1800'lerden 1940'a kadar yaygın bir şekilde kullanılmıştır (164). Bakır sülfat doğru bir şekilde kullanıldığında, konak üzerinde toksik etkisinin az olduğu görülmüştür. Ancak bakır sülfatın ergin parazitlere karşı etkili olmasına rağmen larvalara karşı etkili olmadığı gözlenmiştir (8). Bununla birlikte koyunlar, kronik bakır toksisitesine

karşı duyarlı olmaları nedeni ile bakır uygulamasının dikkatli bir şekilde yapılması gerekmektedir. Yılda bir kez küçük dozlarda (0.5-2 gram) verilen bakır oksitin kuzularda toksik etki yapmaksızın *H. contortus* enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olabileceği bildirilmiştir (165-167).

1940 yılında bakır sülfat yerine fenotiyazin kullanılmaya başlanmıştır. İlaç, hastalığın kontrolü ve elimine edilmesinde oldukça güçlü bir etkiye sahiptir. Fenotiyazin 1:10 oranında tuz konsantrasyonu ile kullanılmıştır. Bu dozun yan etkisinin oldukça az olduğu bildirilmiştir (164). 1960'larda *H. contortus* fenotiyazine direnç göstermeye başlayınca tedavide yeni antihelmintiklerin kullanılması gerektiği düşünülmüştür. Bu nedenle 1961'de Tiyabendazol ismi verilen benzimidazoller geliştirilmiştir (164). Bu ilaç hem ergin hem de larvalara karşı oldukça etkili olmasına karşın birkaç yıl sonra *H. contortus* bu ilaca da direnç göstermeye başlamıştır (2, 168). Daha sonraki yıllarda ise tedavide benzimidazoller yanında imidazothiazoles (levamisole) ve macrocyclic lactones (ivermectin) geliştirilmiştir (169).

Tedavide kullanılan başlıca antihelmintikler şunlardır:

- Benzimidazol grubu (Thiabendazoe, Mebendazole, Albendazole ve Netobimine)
- Tetrhydropyrimidines (Pyrantel, Morantel)
- Salicylanilides (Colsantel)
- Imidazothiazoles (Levamisole)
- Macrocyclic laktonlar (Ivermectin, Moxidecttin)
- Piperazine
- Triclabendazole
- Praziquantel
- Clorsulon

Antihelmintiklerin hedef alanları olarak iyon kanalları, enzimler, yapısal proteinler ve taşıyıcı molekülleri içeren proteinler olduğu kaydedilmiştir (Tablo 2.3). Antihelmintikler oral veya enjekte şeklinde uygulanmaktadır. Antihelmintiklerin dönüşümlü olarak kullanılması ise onların parazitlere karşı etkinliğini artırmaktadır (170).

Tablo 2.3. Yaygın olarak kullanılan antihelmintiklerin hedef alanları (**Kaynak:** Köhler, 2001: 170).

İyon kanalları	Mikrotubuller	Biyoenerji	Bilinmeyen
Tetrahydropyrimidines (Pyrantel, morantel	Benzimidazoles (Thiabendazole, mebendazole, albendazole, netobimine)	Salicylanilides (Closantel)	Praziquantel
Imidazothiazoles (Levamisole)		Chlorinated sulfonamides (Clorsulon)	Triclabendazole
Macrocyclic lactones (Ivermectin, moxidectin) Piperazine			

2.9.1. Benzimidazoller

1961 yılında Tiyabendazolün kullanılması ve etkili sonuç alınmasıyla birlikte etki gücü daha yüksek yeni antihelmintikler keşfedilmiştir. Tiyabendazol helmintlerin birçoğunda etkili bir şekilde kullanılmış ve memeliler için toksisitesi düşük olarak üretilecek yeni ilaçlara zemin hazırlamıştır (171). Helmintlerde bu bileşiklerin etkisi üzerine yapılan çalışmalarda, bu bileşiklerin nematodların bağırsak hücrelerini ve cestodların tegümental hücrelerinin yapısını bozduğu tespit edilmiştir (172). Bu değişiklikler sırasında stoplazmik mikrotubullerin ortadan kalktığı ve benzimidazollerin salgı veziküllerinin mikrotubul bağlı taşınımı inhibe ettiği gözlenmiştir. *H. contortus* enfeksiyonlarında fenbendazolün öldürücü etkisi, bağırsak stoplazmasında salgı veziküllerinin dağılması sonucu salgı veziküllerinin taşınımının inhibe olması ile bağlantılı olduğu gözlenmiştir (173). Benzimidazoller biyokimyasal olarak proteinlerin alt birimi mikrotubullere (tubulin) geri dönüşümsüz ve çok yüksek afinite ile bağlanmakta ve böylece mikrotubullerin yapı ve fonksiyonunu bozmaktadır (174-176). Klasik antimitotik ajan kolşisin ile yapılan çalışmalarda bu bileşiğin polimerizasyon öncesinde ilk olarak tubuline bağlandığı tespit edilmiştir (177, 178). Gelişen mikrotubullere kolşisin taşıyan tubullerin eklenmesi ve başka mikrotubul gelişmesi için diğer tubulin moleküllerinin katılması ile mikrotubuller yeteneğini kaybetmekte ve sonuçta inhibe olmaktadırlar. Spektroskopik analizler ile tubulin polimerizasyonu, β-tubulin monomeri içerisindeki küçük bir bölgenin ilaç bağımlı lokal yayılmasından kaynaklandığını göstermektedir. Böylece benzimidazollerin β- tubulin monomerleri üzerinde bulunduğu ve tubulin polimerizasyonunu inhibe ettiği kaydedilmiştir (179-181). Mikrotubuller ökaryotlarda mitoz bölünme, hareketlilik ve taşınım gibi çeşitli canlı fonksiyonlarına yardımcı oldukça dinamik, sık bulunan hücresel organellerdir. Bu yapıların birçoğu ayrı veya birleşik olarak sürekli dinamik bir şekilde bulunmaktadır. Bazı sistemlerde, ilaç-tubulin etkileşimi sonucunda

serbest tubulinlerin toplanması ve mikrotubullerin kaybı ile bu dinamik yapı bozulmaktadır. Mikrotubuller birçok hücresel süreçte rol oynamakta ve eksikliğinde taşınım, hücre bölünmesi, sinir iletimi ve hücre farklılaşması gibi birçok hücre fonksiyonu bozulmakta ve sonuçta parazitin ölümüne neden olmaktadır (170, 182, 183).

2.9.2. Imidazothiazolller

Imidazothiazol, Levamisol, Tetrahydropyrimidines (pyrantel ve morantael) ve diğer yapısal ilişkili bileşikler nikotinik ilaçlardır. Bu grup ilaçlar kaslar üzerinde bulunan nicotinic acetylcholine (nACh) reseptörlerinin aktivasyonunu engelleyerek sürekli kas kasılması sonucu nematodlar ve diğer parazitlerde spastik kas paralizine neden olmaktadırlar (170, 184).

2.9.3. Macrocyclic laktonlar (Ivermectin)

İvermektin, avermektin'in yarı sentetik bir türevidir. *Streptomyces avermitilis* mikroorganizmasının fermente ürünü olan büyük makrosiklik lakton içermesi nedeniyle Merk tarafından 1980'de antihelmintik olarak kabul edilmiştir. Daha sonraki yıllarda ivermektin'in analogları moxidectin, milbemycin oxime, doramectin, selamectin, abamectin ve eprinomectin üretilmiştir. İvermektin, parazitlerin vücut duvarı kaslarının ve farinksin paralizisine sebep olmaktadır. *H. contortus'*da faringeal yutkunma üzerine ivermektin ve moxidectin'in etkisi üzerine yapılan çalışmalarda her iki ilacın hareket mekanizmasının aynı olduğu ancak bu bileşiklerin hedef bölgelere yanıtlarının farklı olduğu görülmüştür (185). Makrosiklik lakton antiparazitikleri, bloke olan faringeal yutkunma ile parazitlerin beslenmesini inhibe etmekte ve somatik kasların paralizini yapmaktadır. Bu makrosiklik laktonlar glutamate ve gamma-amino butyric aciti (GABA) bağlayarak sinir ve kas hücrelerinin hiperpolarizasyonuna ve böylece parazitin paralize olarak ölümüne sebep olmaktadırlar (170,184, 186).

2.9.4. Praziquantel

Prazinoizokinolin türevi olan praziquantel, stoplazmik membranda kalsiyum permeabilitesini değiştirmekte ve sarkoplazmik retikulum içinde kalsiyum miktarının artmasına ve sonuçta parazitte kas kasılmasına neden olmaktadır (187).

2.9.5. Closantel

Closantel parazitin mitokondrisinde plazma proteinlerine bağlanarak ATP üretimini inhibe etmektedir. Intrategümental PH üzerine Closantel'in etkisini belirlemek için yapılan çalışmalarda Closantel'in birçok helmintin biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerini etkileyen membran aktif bir molekül olduğu tespit edilmiştir (188).

Benzimidazoller ve macrocyclic laktonlar, larva ve erginlere karşı etkili iken imidazothiazoller ergin ve son dönem larvalara etkilidir. 3 grup antihelmintik (Benzimidazoller, makrosiklik laktonlar ve imidazothiazoller) koyunlarda *H. contortus* enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (169).

2.10. ANTİHELMİNTİK DİRENÇLİLİĞİ

Paraziter enfeksiyonlara karşı korunmada en etkili yöntemlerden biri antihelmintik ilaç kullanımıdır. Parazitin konakta çoğalmasını önlemek için, verilen ilacın konaktaki parazite ve bu parazitteki hedefine ulaşması gerekmektedir. Antihelmintik direçliliği, parazite karşı kullanılan ilacın önerilen dozda ya da daha yüksek dozda verildiği halde paraziti etkilememesi veya etkinliğinin zayıflaması olarak tanımlanmaktadır. Parazitlerin antihelmintlere karşı dirençliliği ilk olarak 1957 yılında *H. contortus* enfeksiyonunda fenothiazine karşı saptanmıştır. Daha sonra yapılan saha ve moleküler tabanlı çalışmalar ile birçok nematod da bazı ilaçlara karşı direnç geliştiği görülmüştür (169).

Direnç oluşumunda önemli faktörlerden biri, konaklara sık aralıklarla aynı grup ilacın verilmesidir. Diğer bir faktör ise antihelmintiklerin önerilen dozdan daha düşük dozda kullanımıdır. Konak hayvana göre ilaç dozunun ayarlanması önemlidir. Örneğin keçilere verilecek ilaç dozunun koyunlara verilenden 1.5-2 kat fazla olması gerekmektdir (170). Gastrointestinal nematodlara karşı antihelmintik dirençliliğini etkileyen diğer önemli bir faktör ise konağın beslenme durumudur. Yapılan çok sayıdaki çalışmalar antihelmintiklere karşı direncin, konağın beslenme durumuna ve parazit enfeksiyonlarını düzenleme yeteneğine bağlı olduğunu göstermiştir (189). Ayrıca konağın yaşı, cinsiyeti ve üreme durumuda direnç gelişimini etkileyen ikincil faktörlerdendir.

Genel olarak populasyondaki genetik polimorfizm, direnç bağımlı allellerin sıklığı, katılan genlerin sayısı, direnç mekanizmalarının karmaşıklığı, nematodun biyolojisi, direnç fenotipinde dirençli genlerin dominant veya resesif olup olmaması, tedavi kapsamı, antihelmintiklerin varlığında veya yokluğunda duyarlı ve dirençli genotiplerin üreme formu, tedavi sıklığı, parazit taşınımı ve ilaç dozunu etkileyebilecek diğer uygulamalar gibi faktörler antihelmintik dirençliliğini geliştirmektedir (190).

H. contortus'ta antihelmintik dirençliliği her sınıf antihelmintiğin hedef alanlarına göre farklı şekillerde olmaktadır (Tablo 2.4). Burada 3 ana mekanizma bulunmaktadır. Bunlar: ilaçların bağlanma yerlerinin değişimi, detoks olanlar ve membran taşıyıcılar ile ilaçların akışını sağlamaktır (190).

Tablo 2.4. Antihelmintikler, etki genişlikleri ve etki şekilleri (**Kaynak:** Kerboeuf ve ark, 2003:190)

Sınıf	Etki genişlikleri	Etki şekilleri
Benzimidazoller: Albendazole Fenbendazole Flubendazole Mebendazole Oxfendazole **Probendazolller:** Febantel	Mide-bağırsak nematodları, akciğer kıl kurtları ve cestodlar	Mikrotubullerin tubulin polimerizasyonunu engelleyerek enerji tüketimini artırmak
Imidazothiazol: Levamisole	Mide-bağırsak nematodları ve akciğer kıl kurtları	Asetilkolinesteraz reseptörü ile birlikte çalışır ve spastik paralize neden olur
Makrosiklik Laktonlar: **Avermektinler:** Doramectin, Eprinomectin, Ivermectin, Selamectin **Milbemysinler:** Milbemycin-Oxim Moxidectin	Mide-bağırsak nematodları ve akciğer kıl kurtları	Sinir ve kas hücrelerindeki glutamat klorid kanallarına bağlanarak spastik paralize ve ölüme neden olmaktadır
Piperazin	Mide-bağırsak nematodları	Nematodların GABA reseptörleri üzerine etki ederek nöromuskuler taşınımı inhibe etmektedir
Pyrimidin: Pyrantel, Morantel	Mide-bağırsak nematodları	Asetilkolinesteraz reseptörü ile birlikte çalışır
Salisilanilidler	Mide-bağırsak nematodları	ATP'ye müdahale eder
Amino-asetonitril türevleri Monepantel	Mide-bağırsak nematodları	Nematodların asetilkolin reseptörüne müdahale ederek kasılma ve paralize neden olur
Siklooktadepsipeptitler	Mide-bağırsak nematodları	Potasyum-kalsiyum kanal reseptörlerine müdahale ederek paralize neden olur

Kwa ve ark. (191), benzimidazollere karşı dirençliliğin β tubulin genindeki bir mutasyondan kaynaklandığını göstermiştir. *H. contortus*'taki bu mutasyon tek nükleotit polimorfizmi olarak isimlendirilmektedir. Benzimidazoller β tubulin proteinlerine bağlanmakta ve mikrotubullerin yapısını bozmaktadır. Benzimidazol duyarlı *H. contortus* suşlarında β-tubulin izotip 1 geninde 200. kodonda Phe/Phe (TTC/TTC), 167. kodonda (Phe/Phe [TTC/TTC]) ve 198. kodonda (Glu/Glu [GAA/GAA]) amino asitleri bulunmakta iken dirençli suşlarda ise 200. kodonda ve yabani tip 167. ve 198. kodonlarda Tyr/Tyr (TAC/TAC) amino asiti bulunmaktadır (192). Nematodlarda (*H. contortus, Teladorsagia circumcincta* ve cyathostomelarda) 198 ve 200. kodonlar yabanıl tip olduğunda dirençlilik 167. kodonda (TAC/TAC) gerçekleşmektedir (193-195). 198. kodonda meydana gelen 3.mutasyonda duyarlı parazitlerde Glu/Glu (GAA/GAA) amino asiti bulunurken dirençlilerde Ala/Ala (GCA/GCA) amino asiti bulunmaktadır (196). Benzimidazol dirençli *H. contortus* suşlarında β tubulin izotip 1 geninde 200. kodonda bulunan fenil alaninin (TTC kodonu) tirozine (TAC kodonu) dönüşümü olmaktadır. Son zamanlarda 167 ve 198. kodonlardaki iki yeni mutasyonunda benzimidazoller ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (194, 196).

Bezimidazol duyarlı parazitlerde TTC kodonu, β tubulin izotip 1 proteininde 200 ve 167. pozisyondaki fenil alaninini kodlamaktadır. Benzimidazol dirençli parazitler TAC kodonuna sahiptirler ve bu kodon β tubulin izotip 1 geninde ya 167 ya da 200. kodonda Tirozini kodlamaktadır. Bununla birlikte 200. kodondaki mutasyon çoğunlukla benzimidazol dirençliliği ile ilişkilidir (194, 197, 198). 167 ve 200. kodonlarda meydana gelen her iki mutasyonda resesiftir (194, 199).

H. contortus'ta levamisole karşı dirençlilik, vücut kasları üzerinde bulunan nikotinik asetilkolin reseptörünün sayısının ya da bu reseptörlerin ilaca afinitesinin azalması gibi değişimlere bağlıdır. Nikotinik asetilkolin reseptörü kas dokusu boyunca sodyum, potasyum ve kalsiyumun taşınımı için gereklidir. Bu reseptör merkezi iyon kanallarının etrafında düzenlenmiş 5 alt birimden (2α, 1β, 1γ ve 1δ) oluşmaktadır (200). Normal şartlarda iyon kanalları kapalıdır, ancak levamisol gibi bağlayıcı ligantlar bulunduğunda bu kanallar açılabilmektedir. Kanalların bu şekilde açılması iyonların geçişine izin vermekte ve böylece parazitin paralizine ve kas kasılmasına sebep olmaktadır (201). Asetilkolin reseptöründeki bu değişimler, levamisole az sayıda reseptörün bağlanmasına veya açılan kanalları önleyebilecek reseptörlerin duyarlılığında azalmaya neden olmaktadır (202). Büyük levamisole molekülleri ile olan bu değişimler sonucunda iyon kanalları bloke olmakta veya tamamen kapanmaktadır (201).

Makrosiklik lakton dirençliliğini içeren mekanizma henüz tam olarak bilinmemektedir (170). Blackhall ve ark. (203), yaptıkları çalışmalarda ivermektine dirençli Glutamat girişli klorid kanalları (GluCl) geninin değişimine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Glutamat girişli klorid kanalları asetil kolin reseptörleri gibi iyon kanallarının etrafında düzenlenmiş 5 alt üniteden (α ve β) oluşmaktadır (200, 204). α alt ünitesi glutamat'ın bağlanacağı, β alt ünitesi ise ivermektinin bağlanacağı bölgeleri içermektedir (200). α-subunitin tek bir alelindeki seleksiyon *H. contortus*'a dirençli suşlarda daha sık bulunmaktadır (203). Bu allellerin seleksiyonu sonucu oluşan mutasyonda, ilaç bağlanması ile konformasyonel değişiklikler olabilmekte veya kendisine bağlanmasını inhibe edememektedir (190). GABA reseptör geni, makrosiklik lakton dirençliliğinde bir mekanizma olarak gösterilmiştir. GABA reseptör geninin fonksiyonu GluCl genine benzerdir (205). Makrosiklik laktonlara dirençlilik olarak bilinen bu mekanizma P-glikoproteinlerin (Pgp) detoksifikasyon sürecidir. P-glikoproteinler ilaçları ve taşıma bileşiklerini membrandan taşıyan akışkan taşıyıcılardır. Pgp'ler sindirim sistemi ile sınırlandırılmışlardır ve faringeal ve bağırsak hücreleri membranları üzerinde yüksek oranda ifade edilmişlerdir. Pgp'nin nematodlardaki işlevi tam olarak bilinmemekte, ancak antihelmintiklere geniş oranda bağlanma yeteneğindedir ve böylece organizmayı toksik maddelere karşı koruyabilmektedir (206). P-glikoproteinler yüksek oranda korunmuş trans membran proteinleridir. Bu proteinler, *H. contortus*'ta identifiye edilmiştir ve cDNA sekansı ile elde edilmiştir (207). *H. contortus*'ta Pgp'yi kodlayan en az 7 gen bulunmaktadır (190).

H. contortus'ta antihelmintiklerin her sınıfına karşı bir direnç geliştiği için ortak bir dirençlilik mekanizmasından söz edile bilinmektedir. *H. contortus*'taki antihelmintik dirençliliğinin Pgp'nin ekspresyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Benzimidazoller, levamisol ve ivermektin ortak Pgp sustratlarıdırlar (208). *H. contortus*'un benzimidazol ve ivermektin dirençli suşlarında duyarlı suşlardan daha yoğun Pgp allelleri bulunduğu tespit edilmiştir. Benzimidazoller kullanıldığında Pgp hedef bölgelerde bu ilacın konsantrasyonunu ayarlayabilmektedir (190). Pgp ve benzimidazol dirençliliği arasındaki ilişki Pgp'nin inhibitörü Verapamil'in kullanılması ile gösterilmiştir (209). Verapamil kalsiyum kanallarını bloke etmektedir. Verapamil bir antihelmintik ile verildiğinde ilacın akışını azaltmaktadır (210). Deneysel çalışmalar ile verapamil varlığında ilaçların toksisitesinin artttığı ve benzimidazol dirençliliğinin tersine döndüğü saptanmıştır (209).

Makrosiklik lakton dirençliliğinde (özellikle ivermektin) Pgp'nin rolü çok iyi bilinmektedir. İvermektin nematodlarda Pgp'nin bir substratı olarak tanımlanmıştır. Pgp'nin oranı ivermektin dirençli *H. contortus* suşlarında duyarlı suşlardan daha yüksek oranda

bulunmaktadır. *H. contortus*'un ivermektin dirençli suşlarına verapamil verildiğinde ivermektinin etkisinin arttığı gözlenmiştir (207).

Levamisol dirençliliğinde Pgp'nin rolü tam olarak bilinmemektedir. Ancak levamisolünde ivermektin gibi Pgp'nin bir substratı olarak çalıştığı düşünülmektedir (190).

2.11. ANTİHELMİNTİK DİRENÇLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Antihelmintik dirençliliğinin belirlenmesinde çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Günümüzde parazitolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemler direnç belirleme çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (211). Dirençliliğin belirlenmesinde kullanılan testler 2 grup altında toplanmaktadır. Bunlar in vivo ve in vitro testlerdir. Dirençliliğin belirlenmesinde en çok kullanılan 2 in vivo test bulunmaktadır: Dışkıda yumurta sayısı azalım testi (FECRT) ve Kontrol antihelmintik testi (CET).

Bu güne kadar antihelmintik dirençliliğinin belirlenmesinde çeşitli in vitro testler geliştirilmiş ve koyunların gastrointestinal nematodlarının antihelmintik dirençliliğinin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (212, 213). In vitro testler içerisinde, egg hatch assay (EHA), Larval paraliz ve larval motilite testi, ergin gelişim testi, larva beslenmesini önleme testi (LFIA), biyokimyasal testler, moleküler/genetik testler ve larva gelişim testi (LDA) bulunmaktadır. In vitro testler tam ve daha kesin sonuçlar vermekte ve in vivo testlere göre daha ekonomik olduklarından dirençlilik belirleme çalışmalarında daha sık kullanılmaktadırlar. Ancak in vitro testlerin hepsi bütün antihelmintik ilaçların dirençliliğinin belirlenmesinde kullanılamamaktadır (214).

2.11.1. In vivo Teknikler

1- Dışkıda yumurta azalım testi [Fecal egg count reduction (FECRT)]: Nematodlarda antihelmintik direnç belirleme çalışmalarında en yaygın kullanılan testtir. Bu test bütün antihelmintik sınıflarının direnç belirlenmesinde kullanılmaktadır. Testte antihelmintik tedavisi öncesi ve sonrasında dışkı ile atılan yumurta sayısı modifiye McMaster tekniği kullanılarak karşılaştırılmakta ve böylece antihelmintiklerin etkinliği belirlenebilmektedir. Ancak FECRT testi, tedaviden etkilenmeyen olgunlaşmamış larvaların gelişiminden dolayı levamisol dirençliliğinde bazen yanlış sonuçlar verebilmektedir (215). Strongil tip yumurta üreten çeşitli nematod türlerinde yumurtaları morfolojik olarak birbirinden ayırt etmek zor olmaktadır. Bu nematodlar aynı zamanda çok çeşitli yumurtlama kapasitesine sahiptirler ve hatta aynı cins içerisinde de farklılıklar görülmektedir (216). Yumurtalama kapasitesindeki bu farklılık FECR testinde yanlış sonuçlar verebilmektedir. Düşük maliyetli olması ve daha az

işçilik gerektirmesi nedeniyle dirençliliğin belirlenmesinde çok kullanılmaktadır. Yöntemin dezavantajı ise dışkı ile atılan yumurta sayısının parazit yükü ile ilişkili olmamasıdır (217).

2-Kontrol etkinlik testi (CET): Bu test gold standart bir testtir ve testte tedavi edilen ve edilmeyen hayvanlarda parazit sayısı karşılaştırılarak antihelmintiklerin etkisi belirlenmektedir. Temel olarak nematodların dirençli ve duyarlı izolatları ile doğal enfekte hayvanlarda parazit yükü karşılaştırılmaktadır. Hayvanlar yaklaşık 21-28 gün L3 ile enfekte edilmekte ve daha sonra antihelmintiklerle tedavileri yapılmaktadır. Enfekte hayvanlar ilaç verilen ve verilmeyen şeklinde gruplara ayrılmakta ve tedaviden sonra (10-14 gün) nekropsileri yapılarak parazitler makroskopik olarak identifiye edilmekte ve sayılmaktadır. Bu testin çalışma grubunda yer alan hayvanlarda tedavi öncesi ve sonrası parazit sayısının karşılaştırılabilmesi için nekropsilerinin yapılmasının gerekmesi testin dezavantajı arasında bulunmaktadır. Bu nedenle test yaygın bir şekilde kullanılmamaktadır (218).

2.11.2. In vitro Teknikler

1- Yumurtadan çıkış testi [Egg hatch assay (EHA)]: Ruminantlarda, antihelmintik dirençliliğin belirlenmesinde kullanılan in vitro testlerden birisidir ve uzun yıllar rutin bir şekilde kullanılmıştır. Bu testte benzimidazol ve levamisol dirençliliği belirlenirken, avermektin ve closantel direçliliği belirlenememektedir. Hayvanlara benzimidazol ve levamisol tedavisi uygulandığında, gastrointestinal nematodların duyarlı ve dirençli suşları arasındaki farklılığın belirlenmesi için geliştirilmiştir. Birden çok nematod türü bulunan popülasyonlarda duyarlılığın belirlenmesinde FECR testine göre daha ekonomik ve hızlı karşılaştırma olanağı sağlamaktadır. Bu testte dirençliliğinin belirlenebilmesi için dışkı taze olmalı ve hayvandan alındıktan sonra 3 saat içerisinde incelenmelidir. Bu nedenle saha çalışmalarında pek kullanılmamaktadır (213).

2-Larval paraliz ve motilite testi: Levamisol ve morantel dirençliliğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Larva kültürü ile toplanan 3. dönem larvalara levamisol ve morantelin seri dilisyonlar şeklinde 24 saat inkübasyonundan sonra, larvalar 100X büyütmeli mikroskopta incelenerek normal ve paralize olanlar ayırt edilmiş ve böylece parazitlerin dirençli ve duyarlı suşları tespit edilebilmiştir. Bu testte ilacın uygulama süresi önem taşımaktadır. Antihelmintik çok erken uygulanırsa larvaların gelişimi tamamlanmamakta, eğer çok geç uygulanırsa da larvalara karşı herhangi bir etki göstermemektedir (213).

Test üzerinde çeşitli modifikasyonlar yapılarak levamisol ve benzimidazol ile inkübasyondan sonra ergin nematod ve larvaların hareketlerini belirlemek için mikro-motilite ölçümleri geliştirilmiştir (213).

3-Tubulin bağlanma testi: Bu test ilaçların etki mekanizmasına dayanmaktadır. Benzimidazol dirençliliği antihelmintiklerin tubuline bağlanma afinitesinin azalmasına bağlıdır. Duyarlı ve dirençli nematodların hücre içi proteini olan tubuline benzimidazoller farklı bağlanmaktadır. Test, toz haline getirilen ve tritium ile işaretlenen benzimidazolün enfektif yumurta, larva ve ergin parazitlerden elde edilen tubulin ile inkübasyon sürecini içermektedir. İnkübasyondan sonra serbest, tubuline bağlanmamış ilaçlar körük ile ortadan kaldırılmakta ve tubuline bağlananlar ise sıvı sentilasyon spektrofotometrisi ile sayılmaktadır. Dirençli parazitlerden elde edilen tubulin ekstraktları, duyarlı olanlardan daha zayıf bir şekilde bağlanmaktadır. Test hızlı, sağlam ve parazit popülasyonlarında dirençli suşlardaki küçük değişimlere duyarlı olmakla birlikte çok sayıda larva gerektirmesi nedeni ile saha çalışmalarına uygun bir test değildir (213, 219).

4-Larval gelişim testi (LDA): Test bütün ilaçlara karşı direnç belirleyen testlerden birisidir. LDA koyunların büyük gastrointestinal parazitleri olan *H. contortus, T. colubriformis* ve *O. circumcincta*'ya karşı milbemisin, avermektin, levamisol, benzimidazol kombinasyonları ve benzimidazol dirençliliğini belirlemektedir. Bu testte hasta hayvanların dışkısından izole edilen yumurtalar antihelmintik bulunan mikro-plate kuyucuklarına konularak L3'lerin gelişmesi sağlanmaktadır ve böylece uygulanan antihelmintiğin konsantrasyonunun L3 gelişimini bloke etmesine bakılmaktadır (220).

5- Ergin gelişim testi: Enfekte hayvanların dışkıları ile atılan yumurtaların kültürü yapılması ve ergin dönemlerin incelenmesi esasına dayanmaktadır. Nematodlarda dirençliliğin belirlenmesi için kullanılan bu testin gelişiminde çok küçük ilerlemeler kaydedilmiştir ve kültür tekniğinin zorluğundan dolayı çoğu zaman uygulamada başarısız olunmuştur (221).

6- Biyokimyasal analizler: Biyokimyasal araçlar kullanılarak da direnç belirlenmektedir. Günümüzde bu test yalnızca benzimidazol dirençliliğini belirlemek için kullanılmaktadır. Bu konudaki araştırmalar, benzimidazol dirençli suşlarda, benzimidazolün tubuline bağlanma afinitesindeki azalma üzerine odaklanmıştır (222). Tritium işaretli benzimidazolün tubuline bağlanması ile elde edilen tubulin ekstraktının inkübasyonunu içermektedir. Tubuline bağlanmayan ilaçlar körük ile uzaklaştırılmakta ve tritium işaretli olanlar sıvı sentilasyon aleti ile hesaplanmaktadır. Testin hızlı, sağlam, tekrarlanabilir ve duyarlılığının yüksek olması avantajları arasında yer alırken, çalışmada çok sayıda larvanın kullanılması, laboratuvar araçlarının pahalı olması ve deneyimli elemanların bulunmaması ise dezavantajları arasındadır (221).

7-Moleküler/Genetik testler: Antihelmintik dirençliliğin belirlenmesinde moleküler teknikler, konvansiyonel yöntemlerdeki kısıtlamaların üstesinden gelecek fırsatlar sunmaktadır. Günümüzde ruminantların gastrointestinal nematodlarının evrimsel ve filogenetik ilişkilerinin araştırılmasında çeşitli nükleer, ribozomal ve mitokondrial gen bölgeleri çalışılmıştır (198, 223-229). Ribozomal gen bölgeleri için 18S small subunit, 5.8S ve 28S gibi large subunit, ITS-1 ve ITS-2 gibi non fonksiyonel gen bölgeleri; mitokondriyal gen bölgeleri için ise NAD4 ve COI gibi gen bölgeleri filogenetik ilişkilerin incelenmesinde tercih edilen gen bölgeleri olmuştur (230, 231). *H. contortus*'un benzimidazol dirençli ve duyarlı suşlarını belirlemede RFLP ve alel spesifik PCR gibi çeşitli moleküler teknikler kullanılmaktadır. Bu yöntemler duyarlı olmalarına karşın standartizasyonları zordur ve kantitasyona olanak vermemektedir (154, 228, 232-234). Bu nedenle birçok trichostrongil DNA'sının kantitatif analizi için kolay, hızlı ve güvenilir metodlar geliştirilmiştir. Son zamanlarda küçük ruminantların trichostrongil enfeksiyonlarında benzimidazol direncini belirlemeye yönelik Real-Time PCR tekniği kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknikte floresan işaretli problar kullanılarak PCR çoğaltımını görünür hale getirmekte ve birden fazla paraziti kantitatif olarak eş zamanlı tespit etmesiyle oldukça spesifik bilgiler sağlamaktadır (154, 157). Real-time PCR testi nematodlarda β tubulin izotip 1 geninin 200. kodonundaki duyarlı ve dirençli allelleri tespit edebilmektedir. Bu amaçla çeşitli Taqman probları kullanılmakta ve tek nükleotit polimorfizmi belirlenebilmektedir (198). Real-time PCR tekniği, hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle son yıllarda çok kullanılan tekniklerin başında gelmektedir. (223). Söz konusu teknik ile doğal enfekte koyunlarda sürü bazında benzimidazol dirençliliği kantitatif olarak belirlenebilmekte ve risk potansiyelleri ortaya konabilmektedir (235).

2.12. KORUNMA VE KONTROL

Nematodların kontrolünde kimyasal kontrol yöntemlerine alternatif olarak çeşitli doğal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler içerisinde hayvanları tanenden zengin besinlerle besleme, bakteri ve mantarların kullanımı, besin takviyesi, bakır (copper oxide wire particles-COWP) kullanımı ve antihelmintik özelliği gösteren çeşitli bitkilerin kullanımı bulunmaktadır (236).

2.12.1. Mantar kullanımı

Nematophagous mantarı mera kontaminasyonunu azaltarak hayvanların parazit enfeksiyonunu en aza indirmek için kullanılmaktadır. Mikrofungal türlerin birçoğu yapışkan

özelliği bulunan ağlarla nematod yumurtalarını veya larvalarını tuzağa düşürüp, üretmiş oldukları toksinlerle larvaları hareketsiz hale getirdikten sonra öldürürler (237). Larsen (238), *Duddingtonia flagras* mantarı ile beslenen ruminantlarda, bu mantarın *Trichostrongylus* türlerine ait larvalara ve çeşitli gastrointestinal parazitlere karşı etkili olduğunu kaydetmiştir. Bu şekilde *D. flagras* mantarı kullanılarak merada otlayan hayvanlarda L3 alınımı azaltılmaktadır. Merada L3 sayısındaki bu azalma konaklardaki parazit yükünün azalması ile doğru orantılı olmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda dışkı kültürlerinde 2 gün boyunca 5 gr tahıl/koyun mantar dozunun dışkıdaki larva sayısını azaltmak için yeterli olduğu görülmüştür (239).

2.12.2. Bakteri kullanımı

En eski ve başarılı biyolojik kontrol ajanlarından biri olan *Bacillus thuringiensis* birçok ülkede ticari olarak üretilmekte ve satılmaktadır. Bu bakteri dünyada birçok önemli tarımsal zararlıyı kontrol altına almada kullanıldığı gibi, nematodlara karşı da kullanılmaktadır. *B. thuringiensis*, sığır ve koyunların ektoparazitik artropod ve endoparazitik nematodlarında kontrol amacıyla kullanılmıştır (240). *B. thuringiensis* toksinlerinin aynı zamanda bazı parazitik nematodların serbest yaşam dönemlerini ve trematod serkerlerini etkilediği de kaydedilmiştir (241, 242). Kalsiyum bakterilerin aktivitesini ve mikrobiyal toksinleri etkilemektedir. Böylece yumurtalar üzerindeki geçirgenlik veya iyon değişimindeki bazı değişiklikler bakteri toksisitesini içermektedir (241). Wei ve ark. (243), farklı nematod türlerinde *B. thuringiensis*'in toksisitesini göstermişler ve böylece *B. thuringiensis'in* farklı nematod türlerine karşı kontrolde kullanılabileceğini ve nematodlardaki toksisitesinin bağırsak zararı ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir.

2.12.3. Doğal bitki ekstraklarının kullanımı

Yapılan ön çalışmalar sonucunda küçük ruminantlarda kullanılan antihelmintik ilaçlara alternatif olarak yalancı tesbih ağacı (*Azadirachta indica*)'nın ekstraklarının da kullanılabileceği gösterilmiştir (244). Aynı zamanda papaya, incir ve ananas gibi bitkilerin, bitki öz suyu veya meyvelerindeki sistein proteinazlar nematodların kutikulasını sindirecek yüksek proteolitik aktiviteye sahiptirler. Hindiba, sinir otu ve pelin gibi bitkiler de iç parazitlere karşı antihelmintik özelliği göstermektedirler (245).

2.12.4. Bakır kullanımı

Yapılan bazı çalışmalarda iç parazitlerin kontrolünde bakır kullanılmıştır. Koyunlarda yüksek dozlarda kullanılan bakır oksitin toksisitesi artarken, kuzularda bakır oksitin parazit yükünü azalttığı kaydedilmiştir. Bununla birlikte yaşlı koyunlarda bakır tedavisinin etkili olmadığı

gözlenmiştir (246). Burke ve ark. (246), koyunlarda bakır kullanımında oluşabilecek toksisiteyi azaltmak için uygun olan doz miktarının 0.5 g/kg'dan daha az olması gerektiğini belirtmişlerdir. 0.5 g/kg ağırlık yaşlı keçilerde etkili iken genç keçilerde EPG değerini azalttığı tespit edilmiştir. Araştırıcılar tedavi edilen ve edilmeyen keçilerde toplam hücre hacminin eşit olduğunu gözlemişlerdir. Aynı zamanda enfekte keçilerde bakır oksitin parazitin kan emen formu olan L4'leri etkilemediği ve yalnızca PCV'yi azalttığını tespit etmişlerdir (246).

2.12.5. Tanenler

Tanenler, yüksek moleküler ağırlığa sahip azotsuz, polifenolik yapılı ve genellikle amorf bileşiklerdir. Su ve etanolde çözünür, eter ve kloroformda çözünmezler. İnsekt ve memeli herbivorlara karşı bitkisel savunma mekanizmasına sahiptirler (247). Tanenler kimyasal yapı ve özelliklerine göre hidrolize olabilen ve hidrolize olmayan (kondanse) tanenler olmak üzere 2 ana gruba ayrılmaktadır (248).

Hidroliz olabilen tanenler (HT) (gallotanen, ellagitanen) D-glukoz içeren karbonhidrat molekülleridir (249). Bu karbonhidratların hidroliz grupları ellajik asit veya gallik asit gibi fenolik bileşikler ile esterleştirilir (250). Bu grup tanenler hidrolize olmayan (kondanse) tanenlere göre bitkilerde daha az bulunmaktadır. Hidrolize tanenler, ruminantlar için toksik olan pyrogallol bileşiklerin bir formudur. %20'den daha fazla hidrolize tanenler ile beslenen koyun ve sığırlarda karaciğer nekrozu, böbrek hasarları, kanamalı gastroenteritise bağlı lezyonlar ve yüksek oranda ölümler gözlenmiştir. Aynı zamanda protein absorbsiyonunu ve büyümeyi azaltarak monogastriki etkileyebilir, sindirim sistemi mukozasında hasarlara neden olabilir ve böylece protein ve amino asit atılımında artışa neden olabilmektedir (251).

Kondanse tanenler (CT ya da proantosiyanidinler), ağaç ve çalılarda yaygın olarak bulunan tanen grubudur (252). Bunlar merkezde karbonhidrat taşımazlar; hidrolizle parçalanmaya dayanıklı karbon-karbon bağlı flavonoid ünitelerin oligomer veya polimerleridir. Genel olarak CT'lerin etkisi alım oranına ve yapısına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (253). Düşük oranlarda alındıklarında hayvanların performansını artırabilmektedir. Ancak canlı vücut ağırlığına göre 50 mg/kg'dan daha düşük oranlarda kondanse tanenler ile beslenen hayvanlarda karın şişliği görülmekte, esansiyel protein ve amino asitlerin alımı artmakta, süt ve yün üretimini engellemekte ve aynı zamanda gastrointestinal parazitlere karşı etkili olmaktadır (254). Bununla birlikte yüksek oranlarda CT ile beslenen hayvanlarda besin tüketimi, lifli besinlerin sindirimi ve büyüme oranı düşük olmaktadır (255). Kondanse tanenler nematod gelişimini direk veya indirek etkilemektedir. CT'lerin direkt etkileri

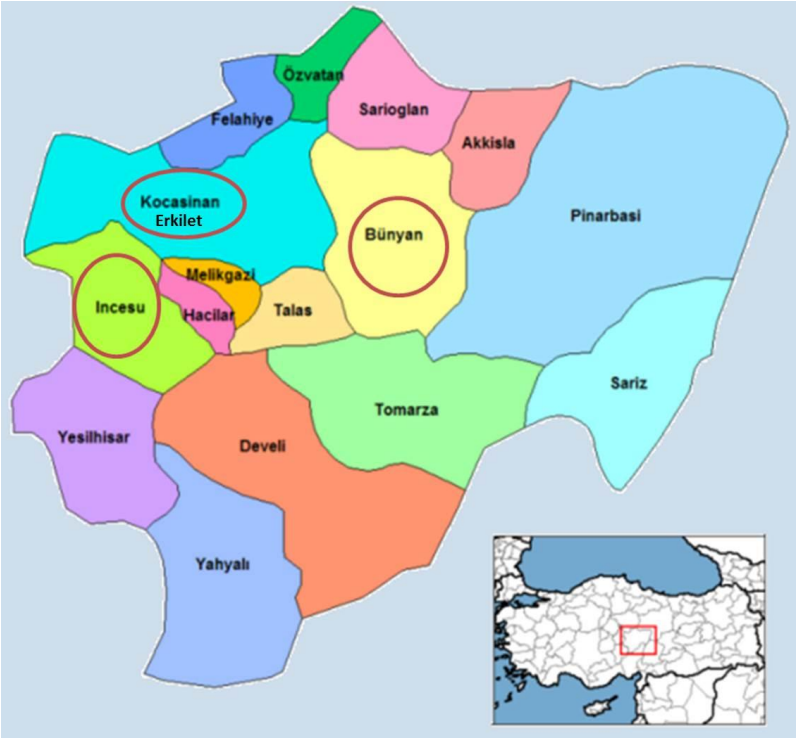
gastrointestinal parazitlerin fiziksel fonksiyonlarını etkileyen CT-nematod etkileşimine bağlı olmaktadır (256). Aynı zamanda kondanse tanenler direk olarak enfektif larvalarının gelişimine ve yumurtalamaya müdahale edebilmektedir (249). Bu şekilde enfektif larva alınımı ve mera kontamisyonunda gastrointestinal parazitler için bir korunma yöntemi olabilmektedir. Kondanse tanenler, proteinlere ve nematod duvarına bağlanarak nematodları inaktif hale getirmekte veya onları öldürmektedir (248). İndirekt etkileri ise mikrobiyal bozulmayı önlemek için rumende proteinlere bağlanarak protein tüketimini artırmakta ve böylece duodenuma daha fazla protein akışına sebep olmaktadır (249). Nematod yumurtalarının enfeksiyon derecesi gram dışkıdaki yumurta sayısına bağlıdır. Kondanse tanenler yumurta üretimini azaltmakta ve larval gelişimi inhibe etmektedir (257). Yapılan çeşitli araştırmalarda tanen ile beslenen koyunlarda tanen ile beslenmeyenlere göre dışkıda yumurta sayısının daha düşük oranlarda görüldüğü tespit edilmiştir. Min ve ark. (257), *Sericea lespedeza* (çin çalı yoncası) ile beslenen keçilerde *H. contortus*'un %89, *Trichostrongylus*'un ise %50 oranında azaldığını saptamıştır. *Quebracho* ağacından elde edilen kondanse tanen ile beslenen enfekte koyunlarda parazit yükünün azaldığı görülmüştür (254). Kahiya ve ark. (258), keçilerin beslenmesinde kullanılan ve %40 kuru madde içeren *Acacia karoo* (tatlı diken) ve *Acacia nilotica* (dikenli akasya)'dan elde edilen kondanse tanenlerin etkisini karşılaştırmışlardır. *A. karoo* ile beslenen keçilerde, dışkı ile atılan yumurta sayısında ve ergin *H. contortus* sayılarında azalmalar olurken, *A. nilotica* ile beslenen keçilerde önemli azalmalar gözlenmemiştir. Bu durumun alınan tanenlerin tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği sonucuna varmışlardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. SAHA ÇALIŞMALARI

3.1.1. Araştırma Sahası

Çalışma, TAGEM alt projesi tarafından desteklenen "Halk Elinde Küçükbaş Islah Projesi Kapsamındaki Akkaraman Irkının Halk Elinde Islahı" başlıklı araştırma projesi kapsamında 2012-2013 yılları arasında Kayseri'nin İncesu, Erkilet ve Bünyan ilçelerinde (Şekil 3.1) çeşitli koyunculuk işletmelerinde toplam 300 baş akkaraman ırkı koyun üzerinde yürütülmüştür.



Şekil 3.1. Örnekleme yapılan istasyonlar

Örneklemeye alınan hayvanların örnekleme merkezi, yaş ve cinsiyete göre dağılımları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. 2012-2013 yılları arasında Kayseri yöresinde örneklenen koyunların örnekleme merkezi, yaş ve cinsiyete göre dağılımları

Örnekleme Merkezi	**Koyun sayısı**				
	Yaş (yıl)		**Cinsiyet**		**Toplam**
	≤2	>2	Erkek	Dişi	
İncesu	15	45	4	56	100
Erkilet	32	60	1	91	100
Bünyan	25	110	7	128	100
Toplam	72	215	12	275	300

3.1.2. Dışkı Örneklerinin Toplanması

Hayvan sahibi veya bakıcıları tarafından zapturapt altına aldırılan her bir hayvanın rektumundan tekniğine uygun olarak yaklaşık 20-30 gr dışkı örneği alınarak steril dışkı

kaplarına konulmuştur (Şekil 3.2). Örneklerin alımı sırasında herhangi bir kontaminasyonun olmasını engellemek için titiz ve tekniğine uygun olarak çalışılmış ve her örnek alımından sonra eldivenler değiştirilmiştir. Dışkı kaplarına protokol numaraları verilerek, örnek alınan koyunların örneklem yeri, yaş ve cinsiyetleri kayıt altına alınmıştır. Alınan örnekler laboratuvara intikal ettirildikten sonra parazitolojik ve moleküler analizlere kadar +4 C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. Saha çalışmaları

3.2. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI

3.2.1. Konvansiyonel Dışkı Muayenesi

Dışkı örneklerinde trichostrongylid yumurtaların aranması amacıyla Çinko-Sülfat flotasyon metodu kullanılmıştır (259). Steril bir dışkı kabına 3-5 gr dışkı örneği alınmış, üzerine 50-100 ml çinko sülfat solüsyonu eklenerek steril spatula veya cam baget ile iyice ezilmiştir. Dışkı süspansiyonu steril çay süzgeci veya steril gazlı bez ile başka bir dışkı kabına süzülerek üzerine kabın yüzeyine yaklaşık 1 cm mesafe kalıncaya kadar çinko sülfat solüsyonu ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışım üzerine 2 adet lamel atılarak yarım saat beklenmiştir. Bu sürenin bitiminde lameller bir pens ile temiz bir lam üzerine alınarak mikroskop altında trichostrongylid yumurtaları yönünden incelenmiştir.

3.2.2. Gram Dışkıdaki Yumurta Sayısının (EPG) Belirlenmesi

Trichostrongylid yumurtaları yönünden pozitif belirlenen örneklerde gram dışkıdaki yumurta sayısı (EPG) modifiye McMaster yöntemi ile aşağıdaki gibi işlenerek ilgili formüle göre hesaplanmıştır (260):

1. Her koyundan 3 gr dışkı örneği tartılarak steril bir dışkı kabına konulmuştur.
2. Bir miktar distile su yardımıyla ezilerek homojen hale getirilmiştir.
3. Karışım steril gazlı bezden cam huni kullanılarak 50 ml'lik tüp içerisine süzülmüş ve üzerine çeşme suyu ilave edilerek hacmi 45 ml'ye tamamlanmıştır.
4. 50 ml'lik tüp 2100 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve tortu oynatılmadan süpernatant atılmıştır.
5. Kalan pelet üzerine 15 ml doymuş tuzlu su eklenmiştir.
6. Tüp 1400 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
7. Tüp üzerinde bombe oluşacak şekilde doymuş tuzlu su eklenmiştir.
8. Tüp üzerine lamel konularak 1 saat bekletilmiştir.
9. 1 saat sonunda lam altındaki damla düşürülmeden temiz bir 15 ml'lik tüp içerisine distile su ile yıkanarak alınmış ve hacmi 10 ml'ye distile su kullanılarak tamamlanmıştır.
10. Tüp hafifçe el yardımı ile çalkalanmış ve 1000 ul alınarak 1.5 ml'lik ependorfa konulmuştur.
11. 1.5 ml'lik ependorf 9000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve oluşan supernatant atılmıştır.
12. Dipte kalan pelet üzerine 1000 ul doymuş tuzlu su eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra McMaster sayım kamerasının gözlerine örnekler alınarak 5 dk beklenmiş ve süre sonunda trichostrongylid yumurtaları yönünden mikroskop altında incelenmiştir.

3.2.3. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Trichostrongylid yumurtaları yönünden pozitif belirlenen örneklerden DNA izolasyonu Bott ve ark. (127)'nın bildirdiği yöntemin modifiye edilmesi ile aşağıdaki gibi yapılmıştır;

1. Her koyundan 3 gr dışkı örneği tartılarak steril bir dışkı kabına konulmuştur.
2. Bir miktar distile su yardımıyla ezilerek homojen hale getirilmiştir.
3. Karışım steril gazlı bir bezden 50 ml'lik tüp içerisine süzülmüş ve distile su ile hacmi 50 ml'ye tamamlanmıştır.
4. Tüp 2100 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve tortu oynatılmadan süpernatant atılmıştır.
5. Dipte kalan pelet üzerine 15 ml doymuş sodyum nitrat çözeltisi eklenmiştir.

6. Tüp 1400 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
7. Tüp üzerinde bombe oluşacak şekilde doymuş sodyum nitrat solüsyonu eklenmiştir.
8. Tüp üzerine lamel konularak 1 saat bekletilmiştir.
9. 1 saat sonunda lamel altındaki damla düşürülmeden temiz bir 2 ml'lik tüp içerisine distile su ile yıkanarak alınmıştır.
10. 2 ml'lik ependorf 9000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
11. Santrifüj sonrası çökelti oynatılmadan supernatant atılmıştır.
12. Son pellet alınarak ön homojenizasyon işlemlerini takiben genomik DNA izolasyon kitleri (Axygen® AxyPrep™ Multisource Genomic Miniprep DNA) ile üreticinin açıklamalarına göre genomik DNA ekstraksiyonu aşağıdaki gibi yapılmıştır.
    a) İşleme başlamadan önce analize tabi tutulana kadar -20^{o}C'de muhafaza edilen son pellet ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözdürülmüştür. İşlenecek numune sayısına göre, örneklerin karışmaması amacıyla ependorf tüplerinin üzerine hayvanlara ait protokol numaraları yazılmıştır. Kit içerisinde bulunan Eluent, önceden ısısı 65^{o}C'ye ayarlanmış su banyosu içerisine konulmuştur.
    b) Çözünmüş pellet üzerine 350 µl PBS (phosphate-buffered saline, not provided) ve 0.9 µl RNase A ilave edilmiş ve 30 sn el yardımıyla nazikçe çalkalanıştır.
    c) 350 µl homojenat pipet yardımıyla 2 ml microfuge tube (provided) içerisine alınmıştır.
    d) Tüp içine 20 µl Proteinase K ve 150 µl Buffer C-L ilave edilerek hemen 1dk vortekslenmiştir.
    e) Tüpler 56°C'de 15 dk su banyosunda inkübe edilmiştir (Her 2-5 dk'da bir vortekslendi).
    f) Tüpler üzerine 350 µl Buffer P-D eklenerek 30 sn vortekslenmiştir.
    g) Daha sonra tüpler 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.

h) 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.

i) 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.

j) 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.

k) Yıkama işlemi sonucu dibe süzülen sıvı kısım uzaklaştırılarak miniprep columnlar boş ependorflar içerisine yerleştirilmiştir. Herhangi bir solusyon eklenmeden boş tüpler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama solüsyonları içerisindeki ethanolün tamamen uçması sağlanmıştır.

l) Herbir örneğe ait miniprep columnlar 1,5 ml'lik yeni ependorf tüplerine yerleştirilmiştir. Üzerlerine, önceden 65^{o}C'lik su banyosuna konulmuş olan Eluent'den 100 µl ilave edilerek oda ısısında 1 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak genomik DNA elde edimiştir. Elde edilen DNA'lar analize tabi tutulana kadar derin dondurucuda (-20 ^{o}C) muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Taqman Prob Bazlı Real Time PCR Analizleri

Trichostrongylid yumurtaları yönünden mikroskobik olarak pozitif belirlenen örneklerden elde edilen genomik DNA ekstraktları *H. contortus*'un ITS-2 gen bölgesini hedef alan spesifik primerler ve prob kullanılarak Real Time PCR'de analiz edilmiştir (261). Bu amaçla kullanılan primerler ve TaqMan probu Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. *H. contortus*'un ITS-2 gen bölgesinin tespiti için Real Time PCR'da kullanılan primerler ve TaqMan prob

	Primer/Prob		**Dizilimi (5'---3')**	**TM* (^{o}C)**
Haemonchus contortus	Primer	ITS-2 F	CATATACATGCAACGTGATGTTATGAA	58.9
		ITS-2 R	GCTCAGGTTGCATTATACAAATGATAAA	59.2
	Prob	ITS-2 P	FAM- ATGGCGACGATGTTC-BHQ1	47.8

*TM: Melting Temperature

Real Time PCR testinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; yörede mezbahalarda kesilen koyunların abomazumlarından toplanan olgun *H. contortus* parazitlerinden genomik DNA'lar elde edilerek pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Real Time PCR analizleri Stratagene Mx 3005P (Stratagene, Agilent Technologies, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR, master mix üreticinin açıklamalarına göre toplam 20 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Brilliant III Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies)	10 µl
ITS-2 F (10 pmol)	1,0 µl
ITS-2 R (10 pmol)	1,0 µl
ITS-2 P (10 pmol)	1,0 µl
Genomik DNA (50 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	6 µl

Real Time PCR amplifikasyonu için termal profil ITS-2 gen bölgesi için 95 ºC 10dk 1 siklus ve 40 siklus 95 ºC 15 sn, 62 ºC 1 dk olarak ayarlanacaktır (261). Real Time PCR analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler ve kantitatif değerler, amplifikasyon eğrileri ve Ct (dR) (Eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

3.2.5. Ribozomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS-2) Geninin Amplifikasyonu

Real Time PCR analizleri sonucu *H. contortus* pozitif belirlenen tüm örnekler *H.contortus* ribozomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS-2) rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu amacıyla ilgili gen bölgesinden ERU-HconITS2F (5'-GTTAACCATATACTACAATG-3') forward ve ERU-HconITS2R (5'-GAGCTCAG GTTGCATTATAC-3') primerleri dizayn edilmiş ve PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon karışımı 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 2.5 mM MgCl2, 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase ve 50 ng/µl template DNA olarak hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 94 C'de 2 dk; 35 siklus, denaturation: 94 C'de 30 s, annealing: 55 C'de 30 s, extension: 72 C'de 1 dk; final extension: 72 C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (262). PCR testinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; yörede mezbahalarda kesilen koyunların abomazumlarından toplanan olgun *H. contortus* parazitlerinden genomik DNA'lar elde edilerek pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

3.2.6. Mitokondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 (mt-COI) Geninin Amplifikasyonu

Örneklerden elde edilen genomik DNA ekstraktları Mitokondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 **(**mt-COI) gen bölgesinin yaklaşık 402 bp parsiyel kısmını amplifiye eden spesifik primerler ile Nested PCR analizine tabi tutulmuştur. Nested PCR analizinin ilk basamağında Nemat-F (5'-CCTACTATAATTGGTGGGTTTGGTAA-3') forward ve Nemat-R (5'-TAG CCGCAGTAAAATAAGCACG-3') reverse primerleri, ikinci PCR basamağında ise COI-N2F (5'-GATTCDTGTTTTGTTGATAYGGG-3') forward ve COI-N2R (5'-TAAAATTAAAATATACACTTCAGGGTG-3') reverse primerleri kullanılmıştır (263). Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, (2.5 mM MgCl2), 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase ve 50 ng/µl template DNA olarak hazırlanmıştır. 1. PCR reaksiyonu için 50 ng/µl template DNA, 2. PCR reaksiyonu için ise ilk reaksiyon sonucu elde edilen amplikondan 2 µl kullanılmıştır. Thermalcyclerda protokol her iki PCR için de initial denaturation: 94 ^{o}C'de 2 dk; 35 siklus, denaturation: 95 ^{o}C'de 30 s, annealing: 50 ^{o}C'de 30 s, extension: 72 ^{o}C'de 1 dk; final extension: 72 ^{o}C'de 10 dk olacak şekilde programlanacaktır (261). Nested PCR'ın geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; yörede mezbahalarda kesilen koyunlardan toplanan *H. contortus* parazitlerinden elde edilen genomik DNAlar pozitif kontrol olarak, sterilize edilmiş deiyonize su ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.7. PCR Ürünlerinin Elektroforez ile Görüntülenmesi

Haemonchus contortus'un ITS-2 ve mt-COI gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonların 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 solusyon, hem jel hazırlanmasında hem de elektroforez tankının içerisinin doldurulmasında kullanılmıştır. Ürünlerin görüntülenmesinde %1,5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Jelin fazla kalın olmaması için 500 ml'lik bir beher içerisinde toplam hacim 50 ml olacak şekilde; 0,75 mg agaroz tartılarak üzerine 50 ml 1XTAE ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım; agaroz, sıvı içerisinde tamamen eriyene kadar ısıtılmıştır. Karışımın buharlaşmasını engellemek amacıyla beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Karışım hazır hale geldiğinde biraz soğumaya bırakıldıktan sonra üzerine 3 µl ethidium bromide ilave edilmiş ve ethidium bromidin sıvı içerisine tamamen dağılması için yavaş bir şekilde bilek hareketleriyle solusyon karıştırılmıştır. Tamamen hazır hale gelen solusyon jel tablasına dökülmüş ve incelenecek örnek sayısına göre taraklar yerleştirilmiştir. Jel tamamen soğuduğunda jel tablası ile birlikte elektroforez tankına yerleştirilmiş ve 1XTAE solusyonu ile dolu tankın içerisinde taraklar yavaşça çıkarılmıştır. Elden edilen PCR ürünlerinin her birinden 10 µl alınıp, 1 µl 6X loading dye (Fermentas) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. İlk gözlere bantların boylarının ölçülmesinde kullanılan DNA ladder (Fermentas), son kuyucuklara ise pozitif ve negatif örnekler yüklenmiştir. Yüklenen örnekler; sabit akımda, 90 V'da 50 dakika süreyle yürütülmüştür. Süre sonunda örnekler jel dökümentasyon sistemi (Gen Genuis) ile UV ışın altında görüntülenmiştir.

3.2.8. *Haemonchus contortus* ITS-2 Gen Bölgesinin Sekansı ve Filogenetik Analizi

PCR sonrası jel üzerinde belirlenen amplikonlar, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Jel pürifiye sonrası amplikonlar PCR primerleri ile ITS-2 gen bölgesinin parsiyel sekansının ortaya konması amacıyla çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi ortaya konan örneklerin BioEdit Sequence Alignment (264) ve Geneious 5.5.5 (265) yazılımları ile pairwise alignmentları yapılarak final dizilim elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) analizleri yapıldıktan sonra Dünya'da GenBank'a kayıtlı diğer benzer izolatlar ile Mega 5.0 (266) ve Geneious 5.5.5 (265) yazılımlarında multiple alignmentları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler

karakterizasyonları ortaya konmuştur. Elde edilen tüm dizilimlerin GenBank kayıtları yapılmıştır.

3.2.9. Beta Tubulin İzotip-1 Geni Tek Nükleotid Polimorfizminin (SNP) Real Time PCR ile Araştırılması ve Allel Sıklıklarının Belirlenmesi

β tubulin izotip-1 gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacıyla *H. contortus*'un benzimidazol duyarlı ve dirençli alellerin kantitatif amplifikasyonu için ayrı ayrı TaqMan prob bazlı Real time PCR analizi yapılmıştır. Bu amaç için kullanılan primerler ve prob Tablo 3.3'de verilmiştir (267).

Tablo 3.3. *H. contortus*'un β tubulin izotip-1 gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizminin tespiti için Real Time PCR'da kullanılan primerler

	Primer/Prob		**Dizilimi (5'---3')**	**TM* (°C)**
Haemonchus contortus	Primer	BtubF	AAATAAGTCTCACCACCTGTAAACA	58.1
		BtubR	TTTCAAAGTGCGGAAGCAGATAT	57.1
		*BtubP S	FAM-TTCGTTGTCAATACAGAATGTTTCATCGGT-BHQ1	62.7
		*BtubP R	FAM- TTCGTTGTCAATACAGTATGTTTCATCGGT BHQ1	62.7

*TM: Melting Temperature, S: Duyarlı, R: Dirençli

Real Time PCR testinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; yörede mezbahalarda kesilen koyunların abomazumlarından toplanan olgun *H. contortus* parazitlerine ait genomik DNA'lar pozitif kontrol, sterilize edilmiş deiyonize su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Real Time PCR analizleri Stratagene Mx 3005P (Stratagene, Agilent Technologies, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR, master mix üreticinin açıklamalarına göre toplam 20 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Brilliant III Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies)	10 µl
Btub F (10 pmol)	1,0 µl
Btub R (10 pmol)	1,0 µl
Btub P (10 pmol)	1,0 µl
Genomik DNA (50 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	6 µl

TaqMan prob tabanlı Real Time PCR amplifikasyonu için termal profil 95 ºC 2dk 1 siklus ve 40 siklus 95 ºC 30 sn, 64 ºC 1 dk olarak ayarlanmıştır (267). Real Time PCR

analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler ve kantitatif değerler, amplifikasyon eğrileri ve Ct (dR) (Eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir. Allel sıklıklarının hesaplanmasında Germer ve ark. (268) tarafından tarif edilen aşağıdaki formülasyon kullanılmıştır. Duyarlı veya dirençli alleller yönünden Ct (dR) vermeyen örneklerin allel frekansı 0 alınırken diğer allel için 100 alınmıştır (269).

$Allel_1$ frekansı=$1/(2^{\Delta Ct}+1)$

$\Delta Ct=(Allel_1Ct- Allel_2Ct)$

3.2.10. β tubulin izotip-1 Geninin Amplifikasyonu

Real time PCR analizlerinde duyarlı allel sıklığı %100, dirençli alleller sıklığı >%39 belirlenen izolatlar β tubulin izotip-1 Geninin 813 bp kısmını amplifiye eden HcTub-s5 (GCCTGGAACGATGGACTCCGT) ve HcTub-as5 (GGCTAACTTGCGAAGAT CAGCAT) primerleri ile PCR analizine tabi tutulmuştur. Reaksiyon karışımı 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 2.5 mM MgCl2, 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase ve 50 ng/µl template DNA olarak hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 95 ^oC'de 2 dk; 35 siklus, denaturation: 94 ^oC'de 30 s, annealing: 55 ^oC'de 30 s, extension: 72 ^oC'de 1 dk; final extension: 72 ^oC'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (196). Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektoforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

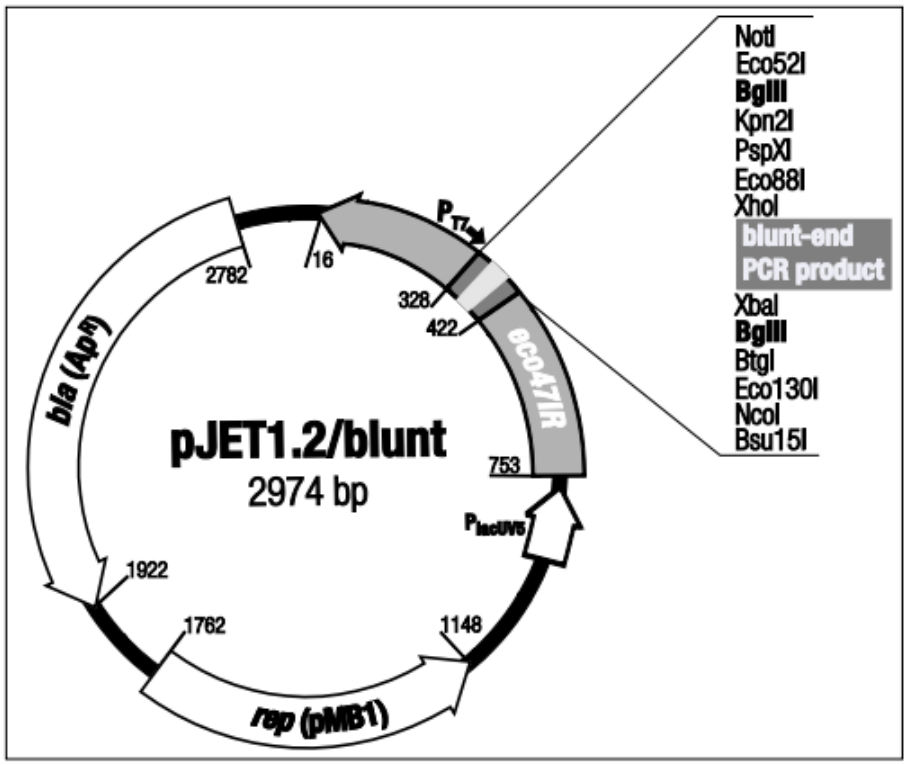
3.2.11. *Haemonchus contortus* mt-COI ve β tubulin izotip-1 Genlerinin Klonlanması

Ligasyon basamağı: Mt-COI ve β tubulin izotip-1 gen bölgelerinin PCR'ı sonucu jel üzerinde belirlenen amplikonlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Jel pürifiye örneklerin klonlanmasında CloneJET PCR Clonning 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 ^{o}C'de su banyosunda 5 dk inkübe edilerek hemen buz üstüne alınmıştır.

Karışım üzerine daha sonra 1 µl pJET1.2/blunt CloningVector (50 ng/ µl) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklenerek son hacmi 20 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 µl'si transformasyon için kullanılmıştır. pJET1.2/blunt CloningVector haritası Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. pJET1.2/blunt CloningVector

Transformasyon Basamağı: 5 µL'lik ligasyon ürünü buz üzerinde tutulan *E. coli* TOP 10 hücrelerine eklendi ve buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. Karışım, önce 42^{o}C'de 1 dk daha sonra buz üzerinde 2 dk bekletildikten sonra üzerine 250 µL SOC Medium eklenmiştir. 37^{o}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^{o}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 µl 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 ^{o}C'de 3 dk; 25 siklus, denaturation: 94 ^{o}C'de 30 s, annealing: 60 ^{o}C'de 30 s, extension: 72 ^{o}C'de 1 dk; final extension: 72 ^{o}C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR sonucu elde edilen amplikonlar %1.5'luk agaroz jelde yürütülüp görüntülenmiştir.

Plasmid DNA: Pozitif bulunan kolonilerden plasmid DNA'sı elde etmek için LB katı besiyerinden steril özeler ile alınan koloniler ampisilinli 5 ml'lik LB sıvı besi yerlerine ekimi yapılarak 37^{o}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 dökülüp pelet daha sonra kullanılmak üzere -20 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

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

1- -20 ^{o}C'de saklanan peletin oda sıcaklığında çözünmesi sağlandıktan sonra üzerine 250 µl Buffer S1eklenmiş 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 edilmiş
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

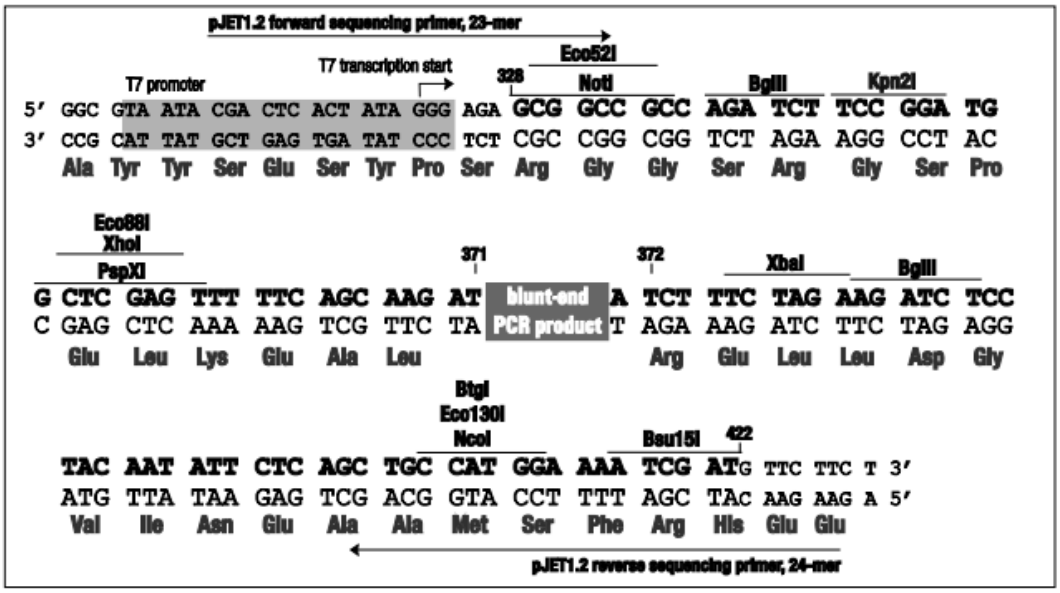
bağlanan Buffer W2'yi uzaklaştırmak için 12.000×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir

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 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

Restriksiyon ve PCR Analizleri: İzole edilen rekombinant plasmidler, restriksiyon enzimleri ile kesilerek ve vektör spesifik primerler ile PCR analizleri yapılarak klonlanan genin varlığı yönünden araştırılmıştır. Enzim kesimi için Aval ve Xbal (Thermo Scientific) enzimleri kullanılmıştır (Şekil 3.4). Elde edilen plasmid DNA'sını restriksiyon enzimleri ile kesmek için aşağıdaki oranlarda master mix hazırlanmıştır:

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



Şekil 3.4 Aval ve Xbal (Thermo Scientific) enzimlerinin bağlanma noktaları

Karışım vortekslenmiş ve 37 ^{o}C'de 5 dk su banyosunda inkübe edildikten sonra %1.5'lik agoroz 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.

3.2.12. Klonlanan mt-COI ve β tubulin izotip-1 Gen Bölgelerinin Sekans, Filogenetik ve SNPs Analizleri

Her iki gen bölgesi için elde edilmiş olan plasmid DNA'lar pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plasmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra BioEdit Sequence Alignment (264) ve Geneious 5.5.5 (265) yazılımları 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 Mega 5.2 (266) ve Geneious 6.1.6 (265) genetik analiz yazılımlarıyla çoklu hizalamaları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur. Elde edilen nükleotid dizilerinin GenBank kayıtları yapılmıştır.

3.2.13. İstatiksel Analiz

İstatistik açıdan incelenen koyunlarda trichostrongylosis prevalansı ile yaş ve cinsiyet faktörlerinin ilişkisi, Fisher's Exact ve Pearson's Chi Square testleriyle araştırılmıştır. *H. contortus* pozitif örneklerde DNA yoğunluğunu dolayısıyla parazitemiyi gösteren eşik değer sikluslarıyla (Ct(dR)) benzimidazol duyarlı ve dirençli allel sıklıklarında araştırma merkezi, yaş ve cinsiyet faktörlerinin ilişkisi Independent Samples T ve Anova testleriyle araştırılmıştır.

4. BULGULAR

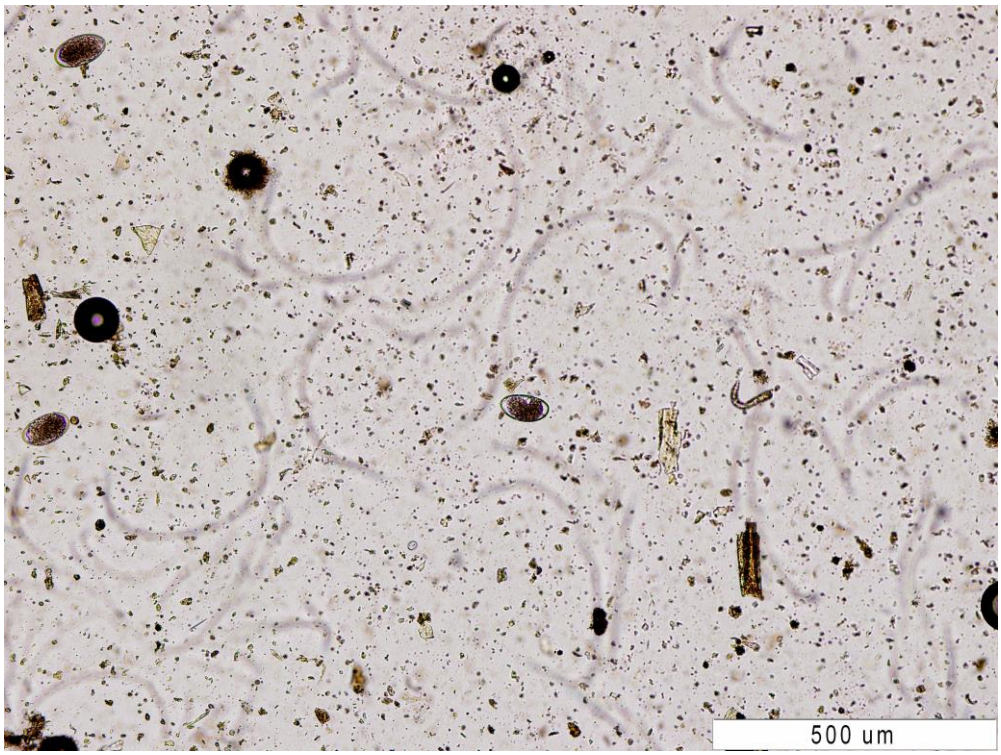
4.1. Konvansiyonel Dışkı Muayenesi Sonuçları

Konvansiyonel dışkı muayenesi sonucunda, incelemesi yapılan toplam 300 koyunun 244'ü (%73,2) çeşitli parazit yumurta ve/veya ookistleri yönünden pozitif bulunmuştur. Dışkı muayenesinde belirlenen parazit etkenlerinin araştırma yöreleri, cinsiyet ve yaşa göre dağılımları Tablo 4.1 'de verilmiştir.

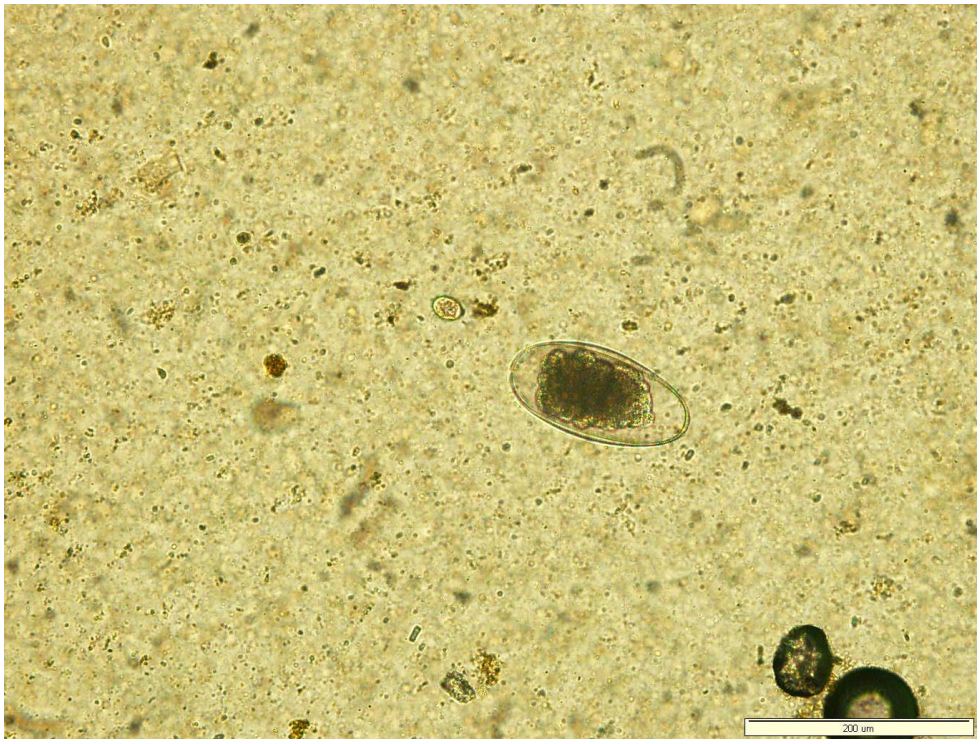
Tablo 4.1'de görüldüğü gibi incelemesi yapılan koyunlarda belirlenen yumurta/ookist tiplerine göre trichostrongylid tip (Şekil 4.1) etkenlerin prevalansı %48,3 ile en yaygın bulunmuş bunu, sırasıyla %36,7 ile *Marshallagia* sp. (Şekil 4.2), % 28,3 *ile Eimeria* sp. (Şekil 4.3), %14,3 ile *Nematodirus* sp. (Şekil 4.4), %4,3 ile *Moniezia* sp. (Şekil 4.5) ve %1.7 ile *Trichuris ovis* (Şekil 4.6) türlerinin izlediği belirlenmiştir.

Tablo 4.1. İncelemesi yapılan koyunlarda dışkı muayenesine göre belirlenen parazitlerin araştırma bölgesi ile koyunların cinsiyet ve yaşına göre dağılımları

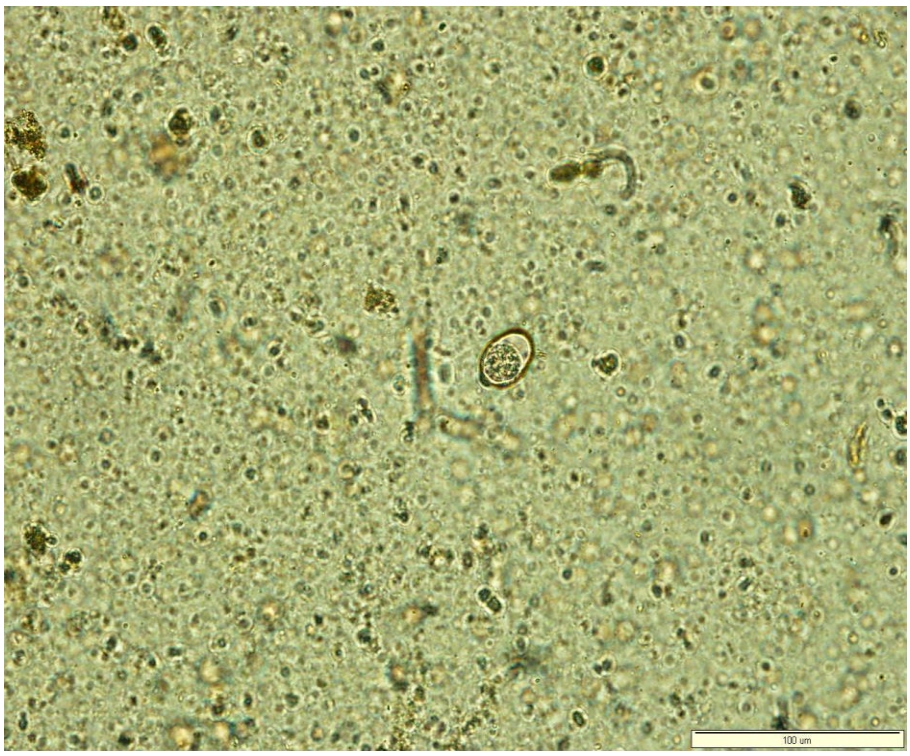
Faktör	İncelenen Hayvan Sayısı	Parazit türü											
		Trichostrongylid tip		*Marshallagia* sp.		*Nematodirus* sp.		*Moniezia* sp.		*Eimeria* sp.		*Trichuris* ovis	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Araştırma bölgesi													
İncesu	100	16	16,0	19	19,0	13	13,0	1	1,0	25	25,0	2	2,0
Erkilet	100	53	53,0	45	45,0	18	18,0	3	3,0	20	20,0	2	2,0
Bünyan	100	76	76,0	46	46,0	12	12,0	9	9,0	40	40,0	1	1,0
Yaş (yıl)													
≤2	78	22	28,2	20	25,6	3	3,84	4	5,1	23	29,4	1	1,3
>2	222	123	55,4	90	40,5	40	18,0	9	4,05	62	27,9	4	1,8
Cinsiyet													
Erkek	12	8	66,7	4	33,3	2	16,7	3	25	2	16,7	-	-
Dişi	288	137	47,6	106	36,8	41	14,2	10	3,47	83	28,9	5	1,7
Toplam	300	145	48,3	110	36,7	43	14,3	13	4,3	85	28,3	5	1,7



Şekil 4.1 Enfekte koyun dışkısında saptanan Trichostrongylid tip yumurta (Orijinal)



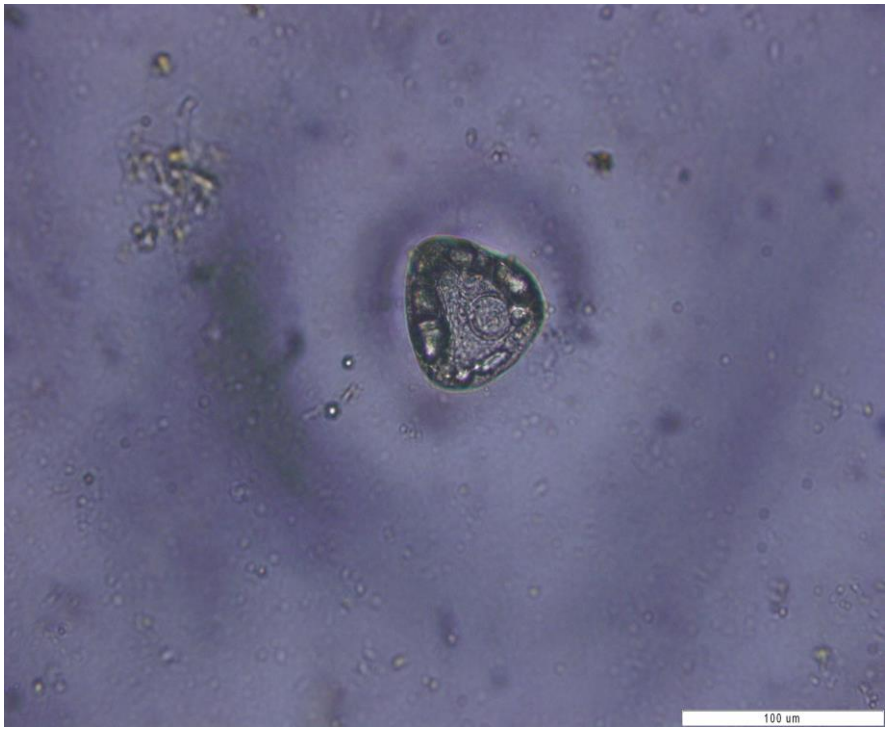
Şekil 4.2. Enfekte koyun dışkısında saptanan *Marshallagia* sp. yumurtası (Orijinal)



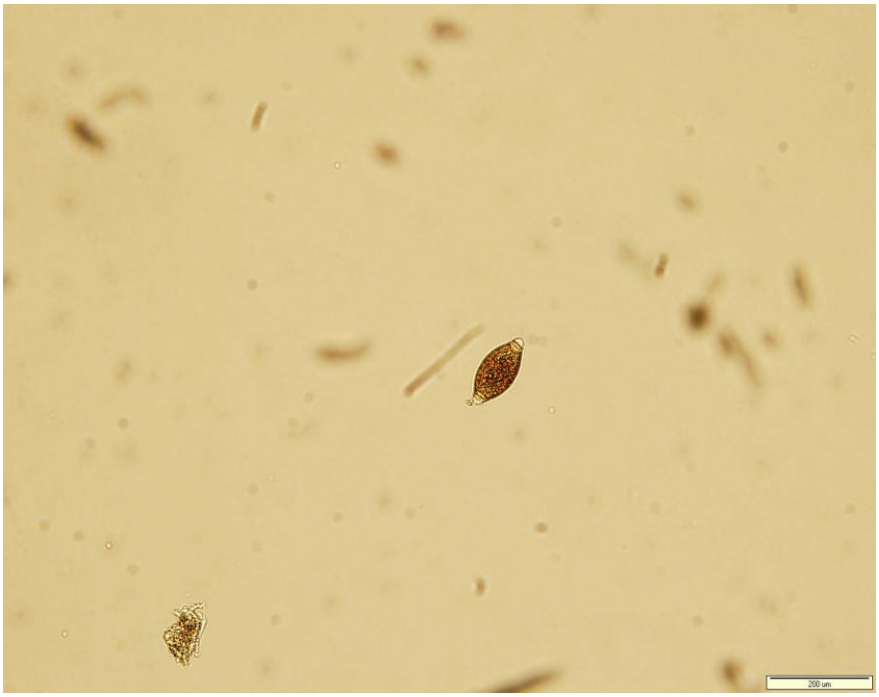
Şekil 4.3. Enfekte koyun dışkısında saptanan *Eimeria* sp. oocysti (Orijinal)



Şekil 4.4. Enfekte koyun dışkısında saptanan *Nematodirus* sp. yumurtası (Orijinal)

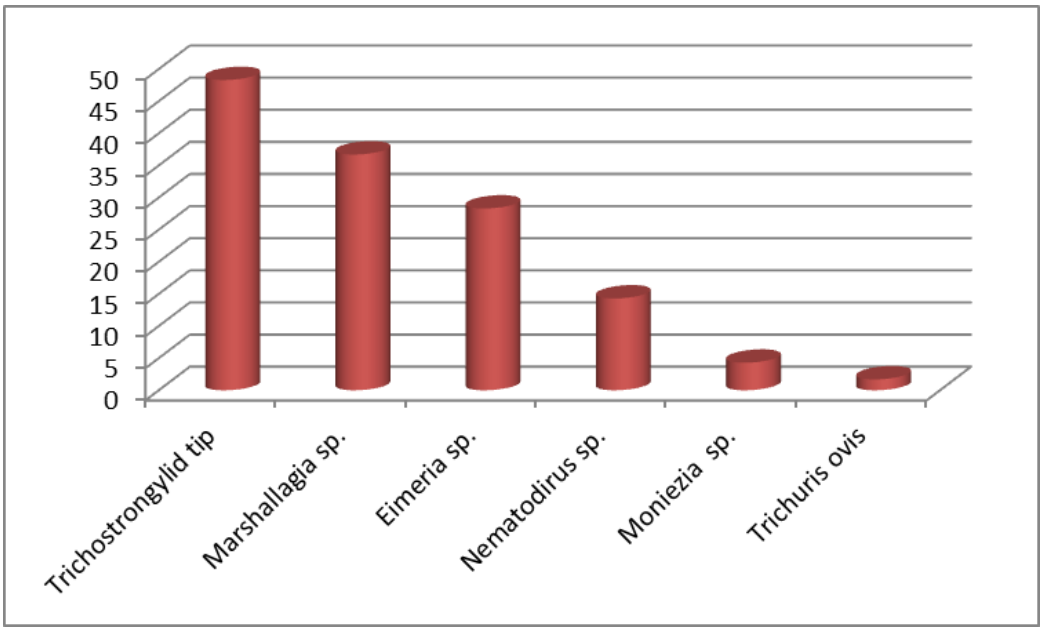


Şekil 4.5. Enfekte koyun dışkısında saptanan *Moniezia* sp. yumurtası (Orijinal)



Şekil 4.6. Enfekte koyun dışkısında saptanan *Trichuris ovis* yumurtası (Orijinal)

İncelemesi yapılan koyunlarda trichostrongylid tip ve diğer parazitlerle enfeksiyonların yüzdesel dağılımı Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.



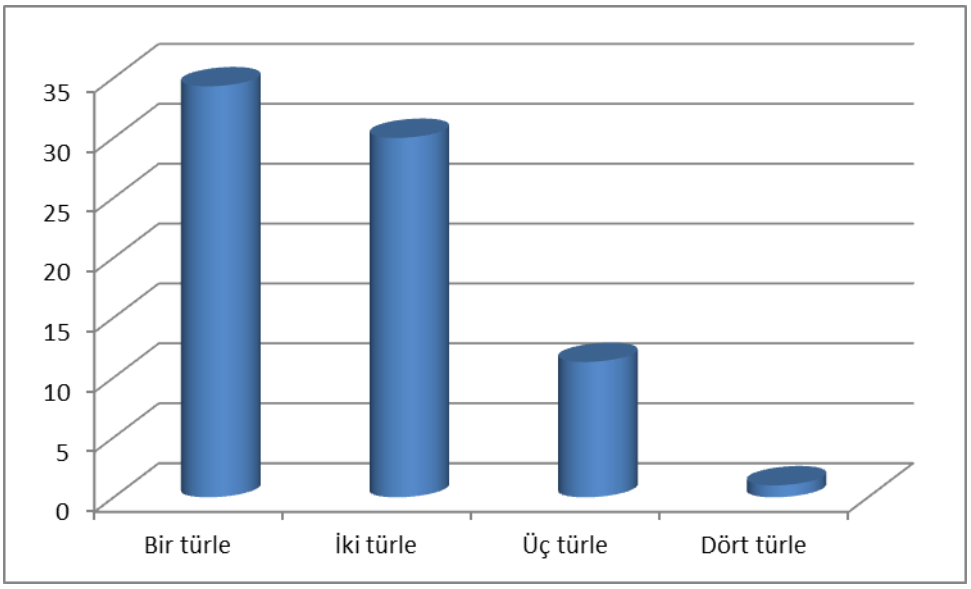
Şekil 4.7. Enfekte bulunan koyunlarda belirlenen parazitlerin yüzdesel dağılımı

Koyunların tek veya daha fazla türle enfeksiyon durumları Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Koyunların tek ve daha fazla türle enfeksiyon durumları

Enfeksiyon durumu	**Enfekte koyun sayısı**									
	Cinsiyet				**Yaş**				**Toplam**	
	Dişi		**Erkek**		**≤2**		**>2**			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Bir türle	100	33,3	3	1,0	29	9,6	74	24,7	103	34,3
İki türle	88	30,7	2	0,7	14	4,3	76	24,3	90	30
Üç türle	32	10,7	2	0,7	4	1,3	30	10,0	34	11,3
Dört türle	2	0,7	1	0,3	-	-	3	1,0	3	1,0

Tablo 4.2.'de görüldüğü gibi en yüksek oran bir ve iki türle enfeksiyonlarda belirlenmiş bunu üç ve dört türle olan enfeksiyonlar izlemiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Koyunların bir ve daha fazla parazitle enfeksiyonların dağılımı

4.2. Gram Dışkıdaki Yumurta Sayısının Belirlenmesi

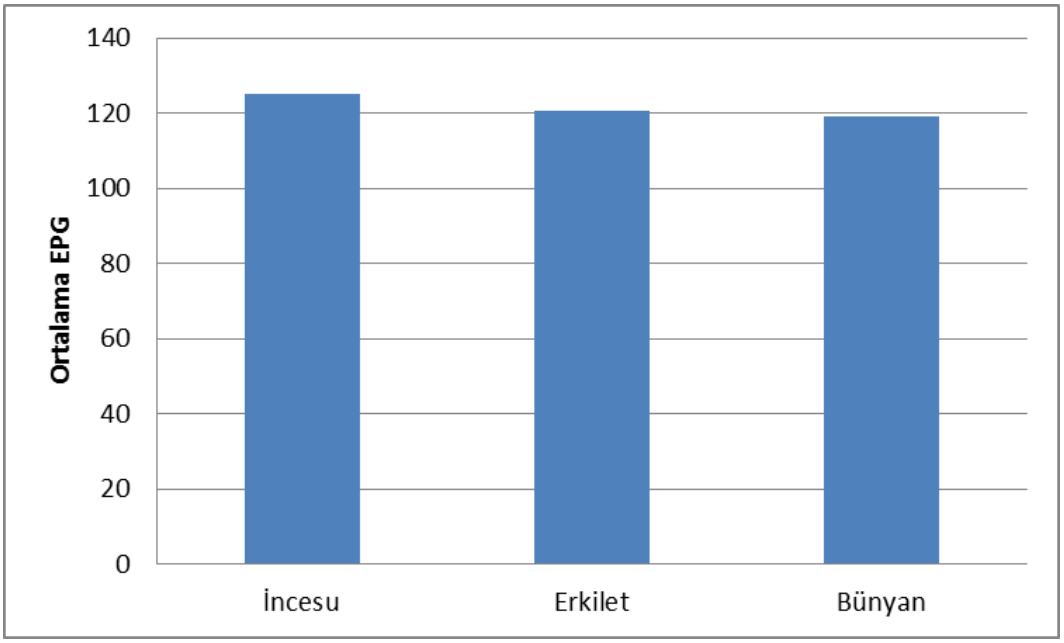
Modifiye McMaster sedimentasyon yönteminde trichostrongylid yumurtaları yönünden pozitif bulunan koyunların gram dışkıdaki yumurta sayısı (EPG) Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Trichostrongylid yumurtaları yönünden pozitif bulunan koyunlarda saptanan EPG değerleri

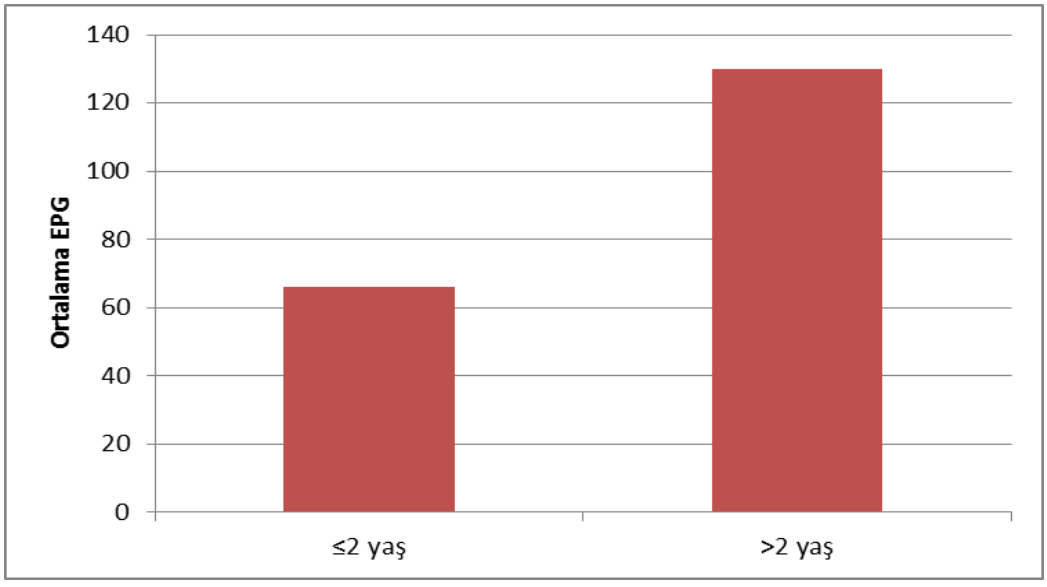
Faktör	Pozitif Hayvan Sayısı	EPG				
		%95 Güven Aralığı	Ortalama	Standart sapma	F	P
Araştırma bölgesi						
İncesu	16	95,8-154,2	125,0	54,8	0,082	0,921
Erkilet	53	105,8-135,7	120,8	54,1		
Bünyan	76	106,8-131,3	119,1	53,5		
Yaş (yıl)						
≤2	22	51,6-80,2	65,9	32,3	32,744	0,000
>2	123	121,0-139,1	130,1	50,7		
Cinsiyet						
Erkek	8	69,1-168,4	118,7	59,4	0,007	0,931
Dişi	137	11,4-129,5	120,4	53,4		
Toplam	145	111,5-129,1	120,3	53,5		

Tablo 4.3'de görüldüğü üzere enfekte koyunlarda gram dışkıdaki yumurta sayısı (EPG) genel olarak ortalama 120,3±53,5 olarak belirlenmiştir. EPG düzeylerinin araştırma

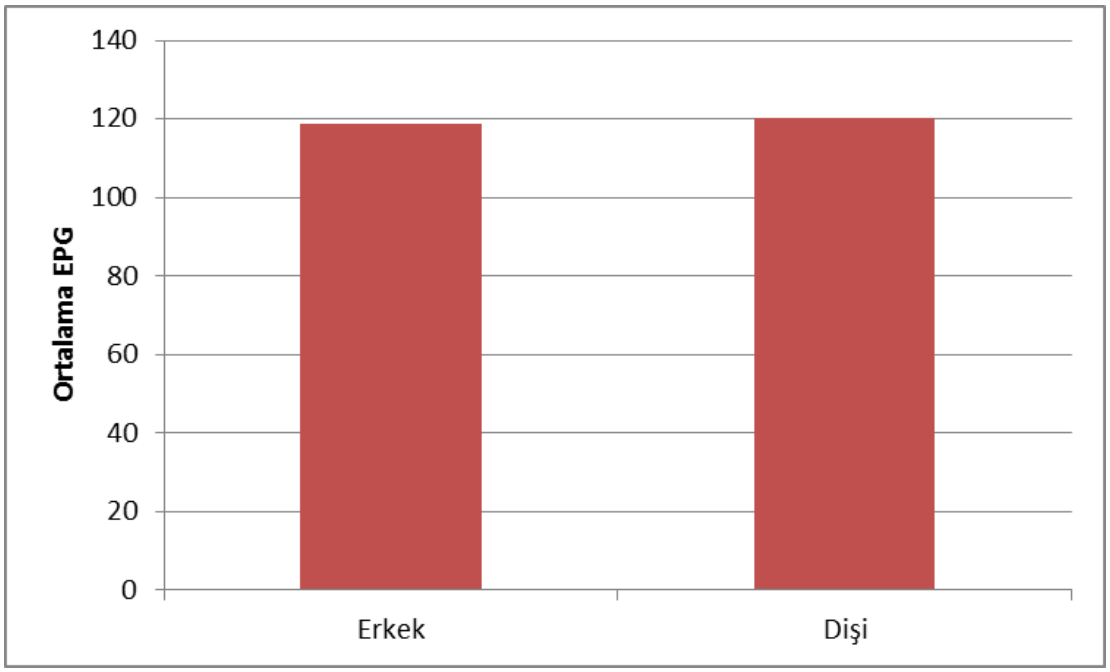
bölgesi ve cinsiyete göre dağılımlarında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmazken (p>0,05), 2 yaş üzeri koyunlarda EPG düzeyleri iki yaş altına göre yaklaşık 2 kat yüksek belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan da önemli (p<0,05) bulunmuştur. Enfekte hayvanlarda belirlenen ortalama EPG değerlerinin araştırma merkezleri, yaş grupları ve cinsiyete göre dağılımları grafiksel olarak sırasıyla Şekil 4.9-Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Enfekte hayvanlarda belirlenen ortalama EPG değerlerinin araştırma merkezlerine göre dağılımları



Şekil 4.10. Enfekte hayvanlarda belirlenen ortalama EPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımları



Şekil 4.11. Enfekte hayvanlarda belirlenen ortalama EPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımları

4.3. Real Time PCR Sonuçları

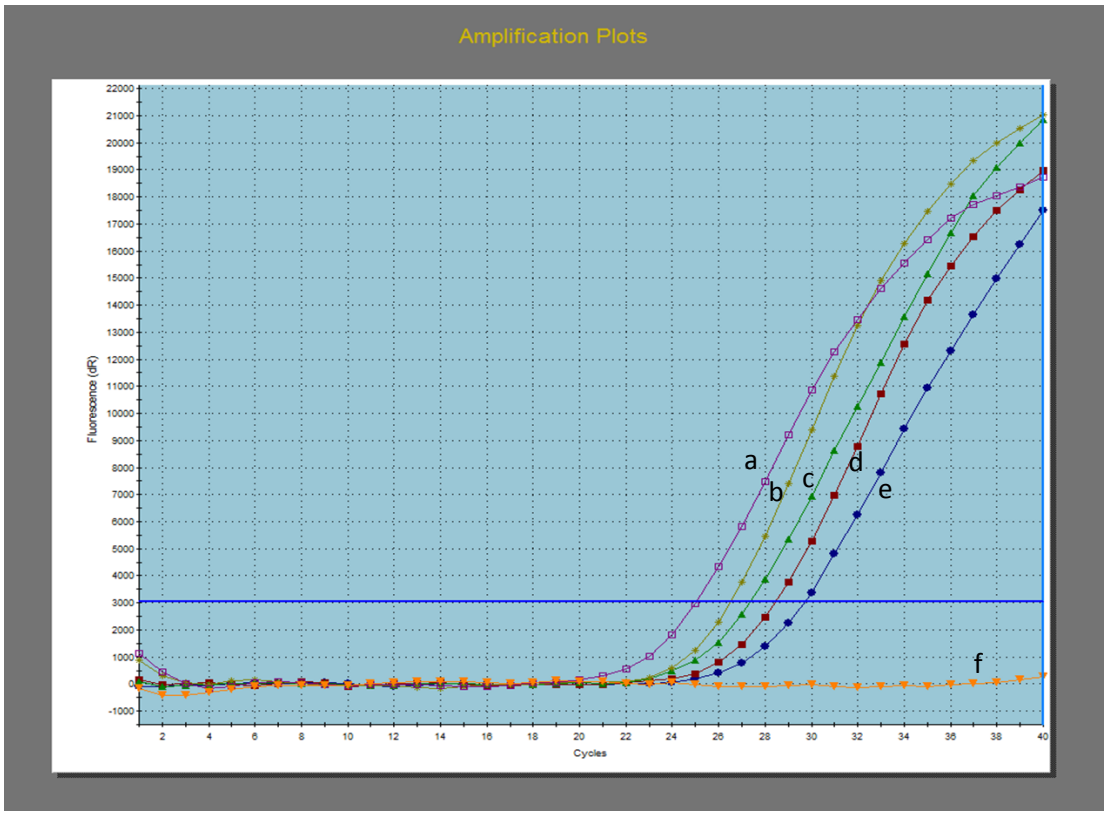
Trichostrongylid yumurtaları yönünden pozitif olan ve Real Time PCR analizleriyle incelemesi yapılan toplam 145 koyundan 36'sı (%24.8) *H. contortus* yönünden pozitif bulunmuştur. *H. contortus* moleküler prevalansı araştırmaya dâhil edilen toplam 300 koyun için de %12 belirlenmiştir. *H. contortus* pozitif örneklerin araştırma merkezleri, yaş grupları ve cinsiyete göre dağılımları istatistiksel analizlerle birlikte Tablo 4.4'de verilmiştir. Tablo 4.4'de görüldüğü gibi *H. contortus* prevalansı en yüksek %27.6 ile Bünyan'dan örneklenen koyunlarda belirlenmiş, bunu sırasıyla %22,6 ile Erkilet ve %18,8 ile İncesu'dan örneklenen hayvanlar izlemiştir. Araştırma merkezlerine göre koyunlarda *H. contortus* prevalansında istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). *H. contortus* pozitifliği >2 yaş grubu ve dişilerde daha yüksek bulunmasına karşın yaş grupları ve cinsiyete göre prevalans oranlarında da istatistiksel farklılık belirlenmemiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.4. Real Time PCR incelemesi yapılan koyunlarda *H. contortus* pozitifliğinin örnekleme merkezi, yaş grupları ve cinsiyete göre dağılımı

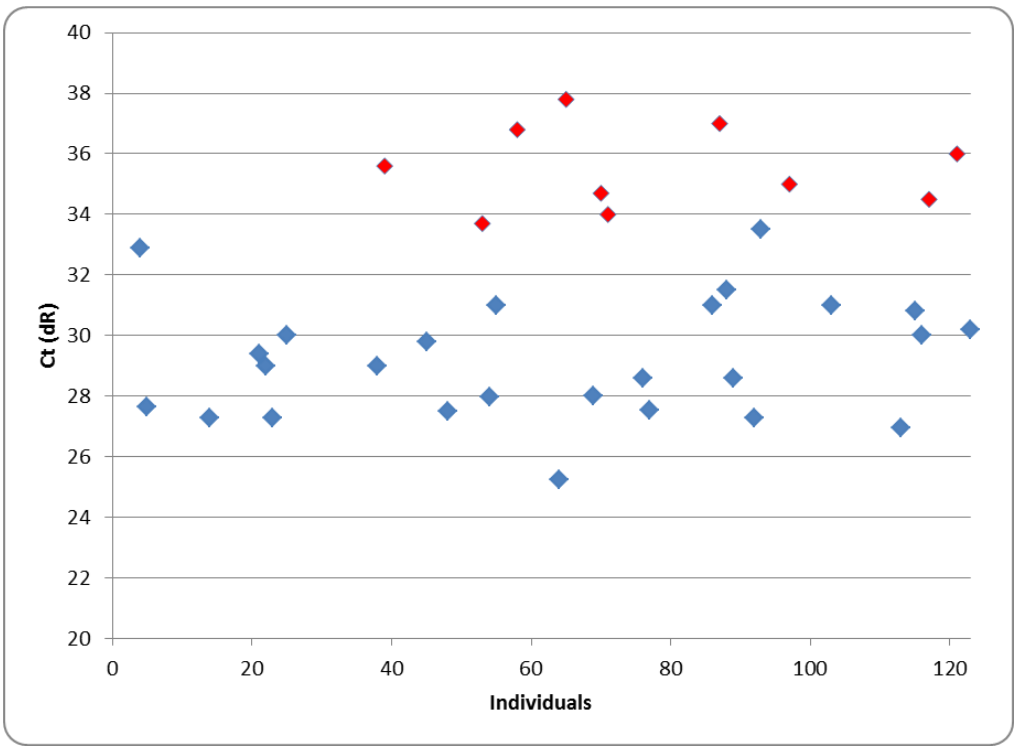
Faktör	**İncelenen Hayvan Sayısı**	**Real Time PCR Pozitifliği**		χ^2	**P**
		n	**%**		
Araştırma bölgesi					
İncesu	16	3	18,8	0,773	0,680
Erkilet	53	12	22,6		
Bünyan	76	21	27,6		
Yaş (yıl)					
≤2	22	5	22,7	1,000	0,521
>2	123	31	25,2		
Cinsiyet					
Erkek	8	1	12,5	0,680	0,365
Dişi	137	35	25,5		
Toplam	145	36	24,8		

χ^2: Pearson Chi-Square

TaqMan prob tabanlı Real Time PCR'da pozitif belirlenen bazı örneklerin *H. contortus* ITS-2 gen bölgesini amplifiye eden spesifik primer ve probla analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri sırasıyla Şekil 4.12'de, tüm pozitif örnekler için saptanan Ct (dR) (Eşik değer siklusu) değerleri de Şekil 4.13'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu *H. contortus* pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon grafikleri. a-e: Pozitif örnekler; f: No DNA



Şekil 4.13. Real Time PCR'da *H. contortus* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı ◆: ≤ 2 yaş grubu; ◆: > 2 yaş grubu

H. contortus pozitif belirlenen örneklerde saptanan Ct (dR) değerlerinin koyunların yaş grupları, cinsiyet ve araştırma merkezlerine göre dağılımı Tablo 4.5'de verilmiştir. Saptanan Ct (dR) değerlerine göre >2 yaş grubunda paraziteminin ≤ 2 yaş grubuna oranla daha yüksek olduğu belirlenmiş ve iki grup arasındaki farklılık da istatistiksel açıdan önemli ($p<0,001$) bulunmuştur. Cinsiyet ve araştırma merkezi gruplarında gözlenen Ct (dR) değerlerindeki farklılık istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur.

Tablo 4.5. Real Time PCR ile *H. contortus* pozitif saptanan örneklerde saptanan Ct (dR) değerlerinin araştırma bölgesi, yaş grupları ve cinsiyete göre dağılımı ve istatistiksel analizleri

Faktör	Pozitif Hayvan Sayısı	Ct (dR)				
		Min-Max	Ortalama	Standart sapma	F	P
Araştırma bölgesi						
İncesu	8	27,0-37,0	31,3	3,61	0,57	0,945
Erkilet	11	25,3-36,8	30,9	3,72		
Bünyan	17	27,3-37,8	30,8	3,26		
Yaş (yıl)						
≤2	10	25,3-33,5	29,2	1,96	86,93	0,000
>2	26	33,7-37,8	35,5	1,37		
Cinsiyet						
Erkek	3	25,3-36,8	31,0	5,78	0,000	0,998
Dişi	33	27,0-37,8	30,9	3,23		
Toplam	36	25,3-37,8	30,9	3,38		

F: Anova Testi

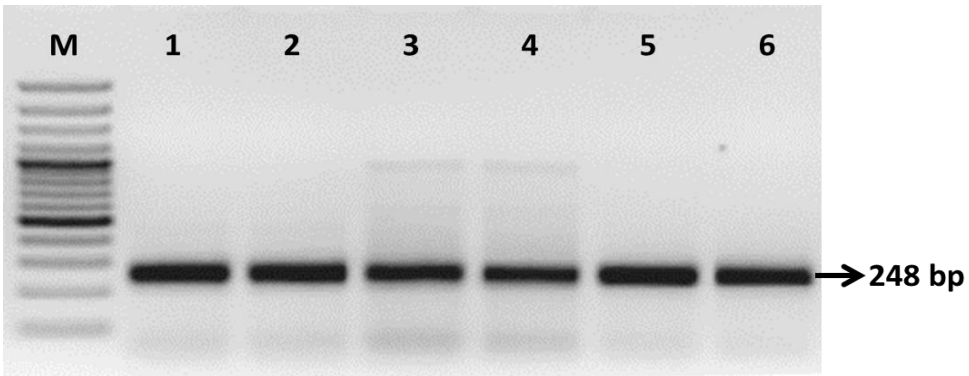
4.4. ITS-2 Geninin Amplifikasyonu ve Sekans Analizi

Real Time PCR ile pozitif belirlenen örneklerde *H. contortus* izolatlarının filogenetik analizleri için, GenBank'ta mevcut çeşitli *H. contortus* ve yakın diğer trichostrongylid nesillerinin ribozomal RNA gen bölgeleri analiz edilmiş ve ITS-2 gen bölgesinden spesifik orijinal primer dizaynı yapılmıştır. Dizayn edilen primer dizilerinin GenBank'ta kayıtlı çeşitli *H. contortus* izolatlarının ilgili gen bölgesi sekanslarıyla alignmentları Şekil 4.14'de gösterilmiştir. Şekil 4.14'de görüldüğü gibi, forward primer ERU-HconITS2F ve ERU-HconITS2R'nin *H. contortus* için spesifik olduğu belirlenmiştir.



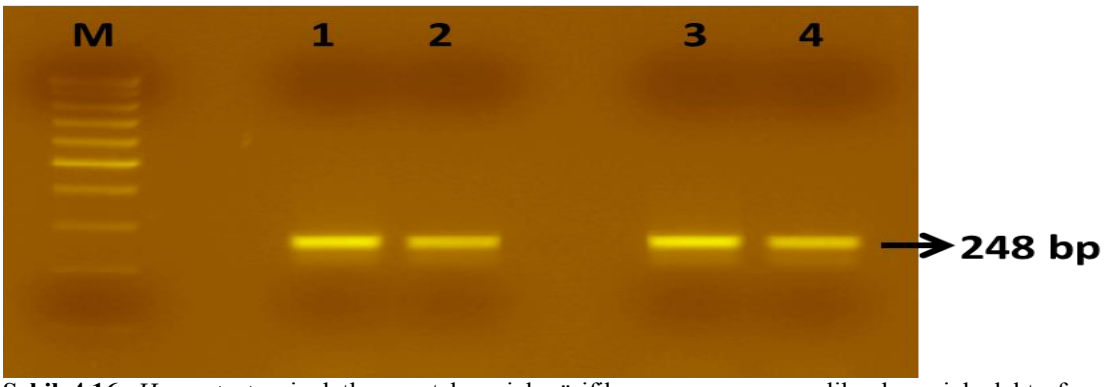
Şekil 4.14. *H. contortus* ITS-2 gen bölgesini hedef alan orijinal primer dizilerinin çeşitli trichostrongylid türlerine ait izolatların sekans dizileri ile hizalamaları ve spesifiteleri

Real Time PCR analizlerinde *H. contortus* pozitif belirlenen örneklerin parsiyel ITS-2 gen bölgesinin PCR analizleri sonucunda Ct (dR) değerleri 36'nın altında bulunanların jel üzerinde 248 bp büyüklüğünde amplifikasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bazı pozitif izolatlarda parsiyel ITS-2 gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonların %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.15. *H. contortus* pozitif izolatların parsiyel ITS-2 gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 1-5: Pozitif izolatlar; 6: Pozitif kontrol

ITS-2 genini parsiyel olarak amplifiye eden primerler ile PCR sonucu pozitif belirlenen ve uygun konsantrasyonda olan toplam 4 izolat sekans analizlerine tabii tutulmuştur. Bu izolatların sekans kalitesini artırabilmek için amplikonlar jel pürifikasyon sonrası tekrar aynı primerler ile PCR amplifikasyonuna tabii tutulmuştur (Şekil 4.15). Örnekler PCR amplifikasyonunu takiben tekrar jel pürifiye edilerek sekans için hazır hale getirilmiştir.

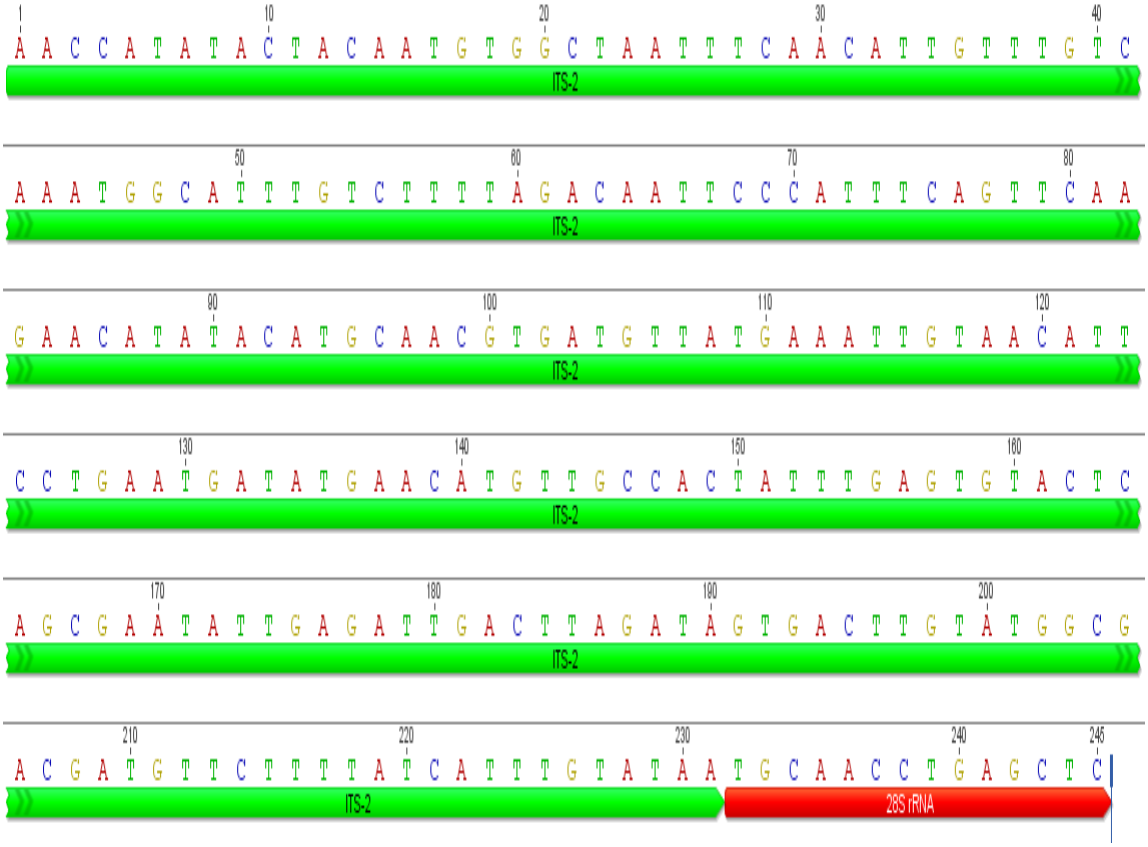


Şekil 4.16. *H. contortus* izolatlarının tekrar jel pürifikasyon sonrası amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 1: TrERUHcon04 izolatı; 2: TrERUHcon05 izolatı; 3: TrERUHcon06 izolatı; 4: TrERUHcon07 izolatı

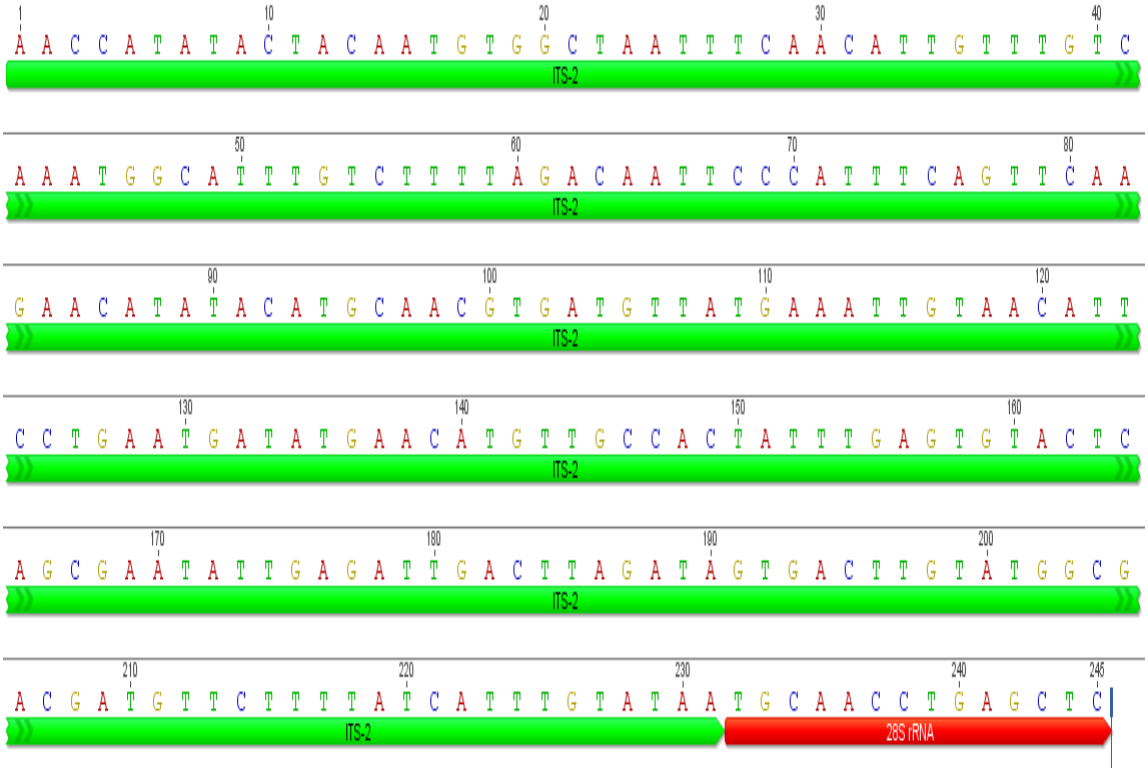
Ribozomal ITS-2 geni yönünden izolatlara ait DNA dizilerinin, konak, izolasyon kaynağı, gelişim dönemi ile GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.6'da, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.17-4.20'de verilmiştir.

Tablo 4.6. Kayseri yöresinde koyunlarda belirlenen *H. contortus* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler ve GenBank aksesyon numaraları

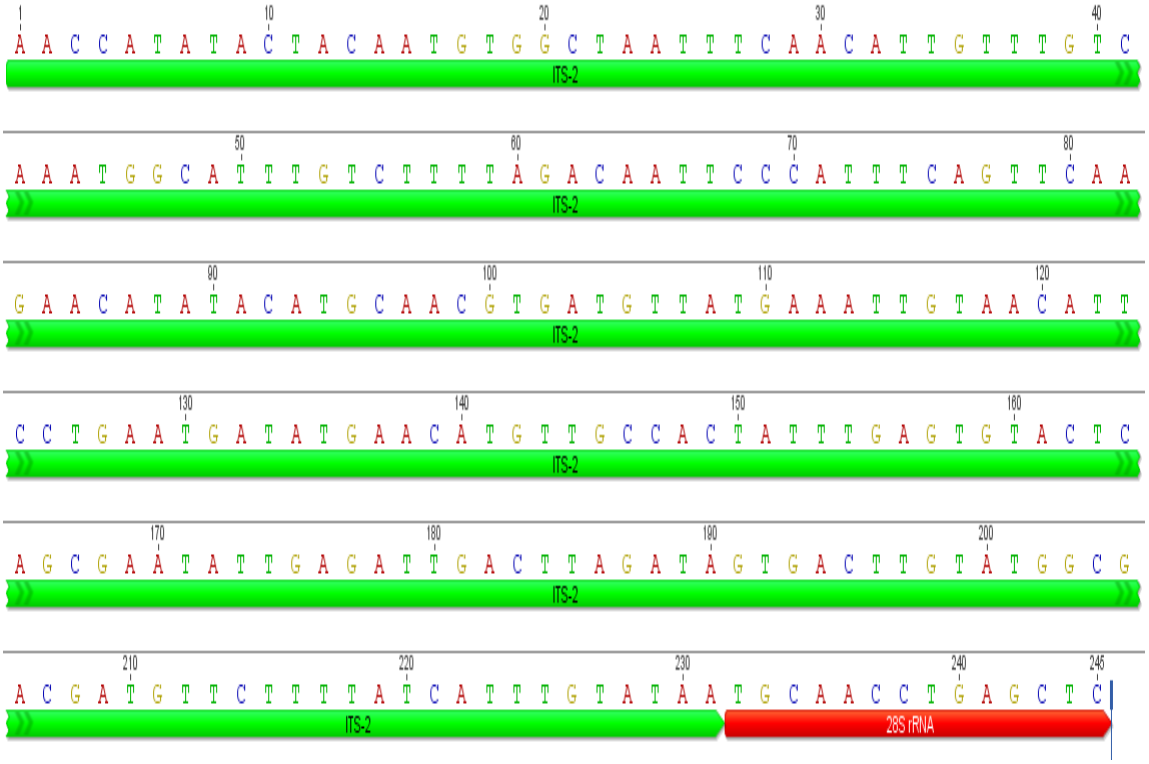
İzolat	**Gen bölgesi**	**Konak**	**İzolasyon kaynağı**	**Gelişim dönemi**	**GenBank Aksesyon Numarası**
TrERUHcon04	ITS-2/28S	Koyun	Dışkı	Yumurta	KJ188203
TrERUHcon05	ITS-2/28S	Koyun	Dışkı	Yumurta	KJ188204
TrERUHcon06	ITS-2/28S	Koyun	Dışkı	Yumurta	KJ188205
TrERUHcon07	ITS-2/28S	Koyun	Dışkı	Yumurta	KJ188206



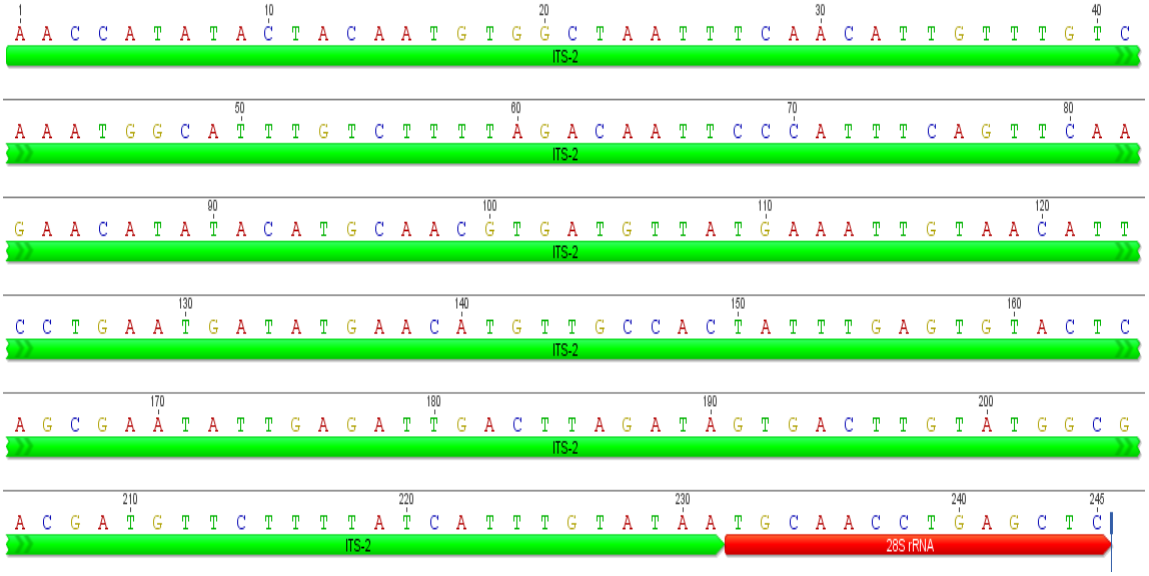
Şekil 4.17. TrERUHcon04 izolatının complete ITS-2/partial 28S rRNA nükleotit dizilimleri (KJ188203)



Şekil 4.18. TrERUHcon05 izolatının complete ITS-2/partial 28S rRNA nükleotit dizilimleri (KJ188204)



Şekil 4.19. TrERUHcon06 izolatının complete ITS-2/partial 28S rRNA nükleotit dizilimleri (KJ188205)



Şekil 4.20. TrERUHcon07 izolatının complete ITS-2/partial 28S rRNA nükleotit dizilimleri (KJ188206)

4.5. *H. contortus* izolatlarının ITS-2 Geninin Moleküler Karakterizasyonu ve Filogenetik Analizi

Kayseri yöresinde koyunlardan elde edilen *H. contortus* izolatlarıyla ribozomal ITS-2 gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan GenBank veri tabanında kayıtlı Dünya'daki diğer bazı *H. contortus* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Araştırma yöresinde belirlenen *H. contortus* izolatları ile Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer *H. contortus* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	Orijin	İzolasyon kaynağı	Gelişim dönemi	Aksesyon Numarası
3	Brezilya	Koyun	Ergin	JN128897
4	Brezilya	Koyun	Ergin	JN128898
-	Brezilya	Koyun	Ergin	JQ342247
-	Çin	Koyun	Ergin	HQ844231
-	İran	Koyun	Ergin	HQ389229
-	Özbekistan	Koyun	Ergin	KC503915
As3701	Mısır	Koyun	Ergin	AB682686
field variant 2	Yeni Zellanda	Koyun	Larva 3	KC998714
H992C9	Amerika	Koyun	Larva 3	EU086381
H992C11	Amerika	Koyun	Larva 3	EU086383
Hcch08	İtalya	Dağ keçisi	Ergin	FN432336
HcPS03	Malezya	Koyun	Ergin	HQ683712
HS123	Avustralya	İnsan	Yumurta	KC632567
i-2	Mongolya	Keçi	Ergin	JN590056
i-5	Mongolya	Keçi	Ergin	JN590055
pDNA 22	Amerika	Keçi	Larva 3	EU084691
TrERUHcon04	Türkiye-Kayseri	Koyun	Yumurta	KJ188203
TrERUHcon05	Türkiye-Kayseri	Koyun	Yumurta	KJ188204
TrERUHcon06	Türkiye-Kayseri	Koyun	Yumurta	KJ188205
TrERUHcon07	Türkiye-Kayseri	Koyun	Yumurta	KJ188206

Kayseri yöresinde koyunlarda belirlenen ve nükleotid dizisi ortaya konan *H. contortus* izolatları ile Dünyanın çeşitli ülkelerinden multiple alignmenta dâhil edilen diğer izolatların ITS-2 gen bölgesi yönünden nükleotid kompozisyonları Tablo 4.8'de, pairwise alignmentları ise Tablo 4.9'da verilmiştir.

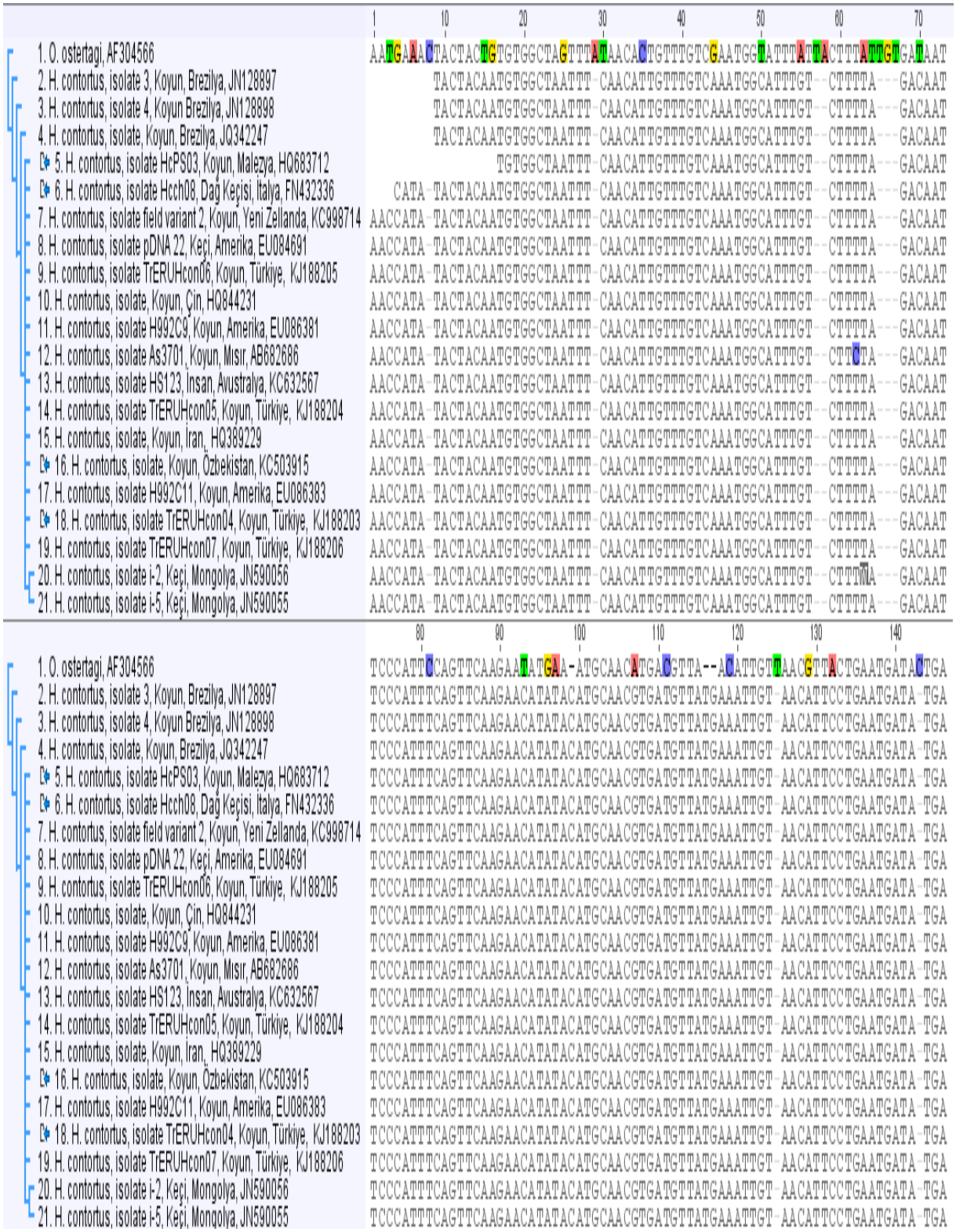
Tablo 4.8. ITS-2 gen bölgesi yönünden multiple alignmentları yapılan *H. contortus* izolatlarının nükleotid kompozisyonları

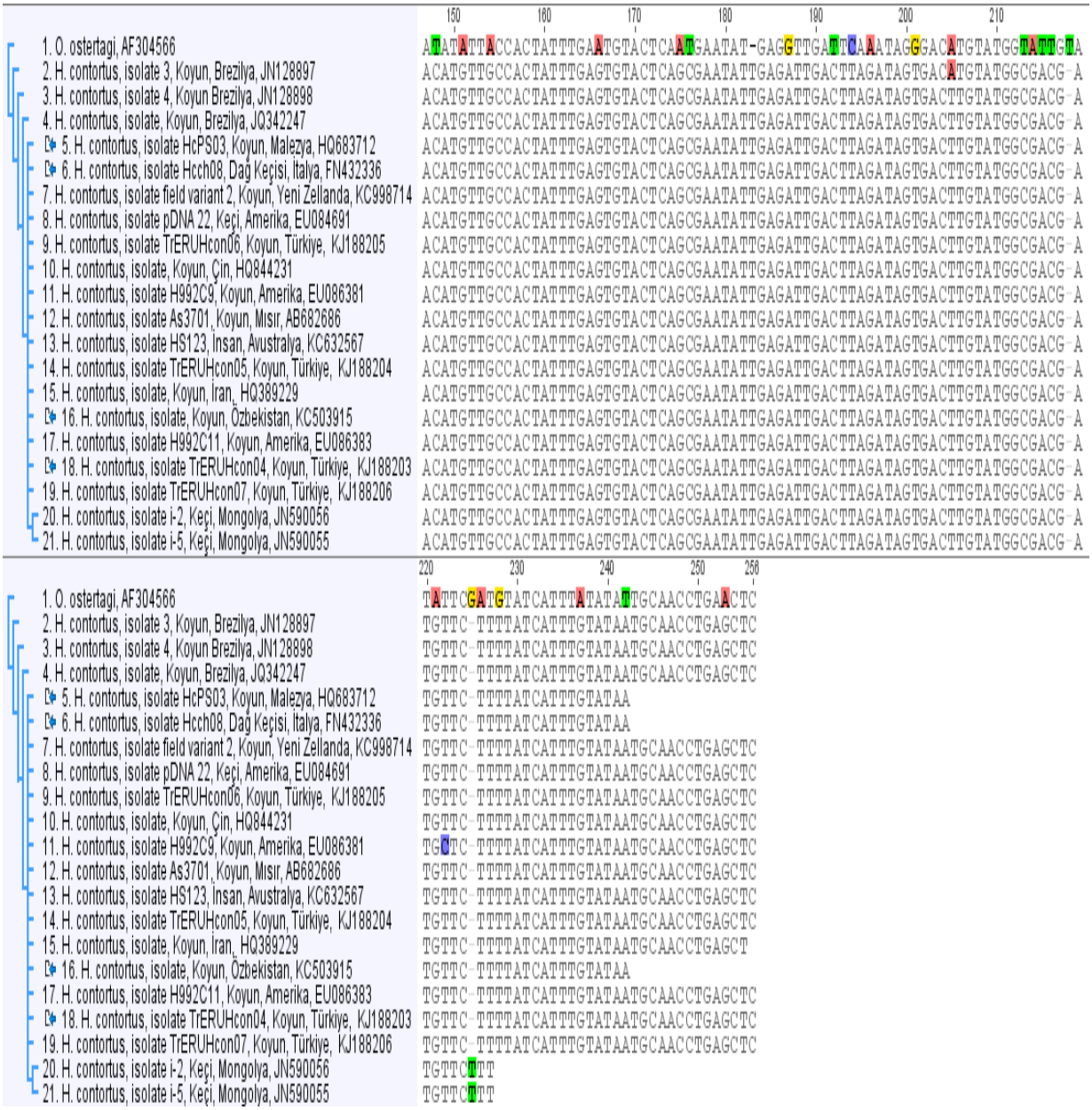
İzolat Aksesyon No	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)	Toplam nükleotid sayısı
JN128897	35,7	16,4	29,8	18,1	65,5	34,5	238,0
JN128898	36,1	16,4	29,4	18,1	65,5	34,5	238,0
JQ342247	36,1	16,4	29,4	18,1	65,5	34,5	238,0
HQ844231	35,5	16,7	30,2	17,6	65,7	34,3	245,0
HQ389229	35,7	16,4	30,3	17,6	66,0	34,0	244,0
KC503915	36,4	15,6	30,7	17,3	67,1	32,9	231,0
AB682686	35,1	17,1	30,2	17,6	65,3	34,7	245,0
KC998714	35,5	16,7	30,2	17,6	65,7	34,3	245,0
EU086381	35,1	17,1	30,2	17,6	65,3	34,7	245,0
EU086383	35,5	16,7	30,2	17,6	65,7	34,3	245,0
FN432336	36,8	15,4	30,3	17,5	67,1	32,9	228,0
HQ683712	37,5	14,8	29,2	18,5	66,7	33,3	216,0
KC632567	35,5	16,7	30,2	17,6	65,7	34,3	245,0
JN590056	35,2	16,2	30,6	18,1	65,7	34,3	216,0
JN590055	35,5	16,1	30,4	18,0	65,9	34,1	217,0
EU084691	35,5	16,7	30,2	17,6	65,7	34,3	245,0
KJ188203	35,5	16,7	30,2	17,6	65,7	34,3	245,0
KJ188204	35,5	16,7	30,2	17,6	65,7	34,3	245,0
KJ188205	35,5	16,7	30,2	17,6	65,7	34,3	245,0
KJ188206	35,5	16,7	30,2	17,6	65,7	34,3	245,0
Ortalama	35,7	16,4	30,1	17,7	65,8	34,2	238,1

	AB682686	EU084691	EU086381	EU086383	FN432336	HQ389229	HQ683712	HQ844231	JN128897	JN128898	JN590055	JN590056	JQ342247	KC503915	KC632567	KC998714	KJ188203	KJ188204	KJ188205	KJ188206
AB682686		99.6%	99.2%	99.6%	99.6%	99.6%	99.5%	99.6%	99.2%	99.6%	99.5%	99.3%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%
EU084691	99.6%		99.6%	100%	100%	100%	100%	100%	99.6%	100%	100%	99.8%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
EU086381	99.2%	99.6%		99.6%	99.6%	99.6%	99.5%	99.6%	99.2%	99.6%	99.5%	99.3%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%
EU086383	99.6%	100%	99.6%		100%	100%	100%	100%	99.6%	100%	100%	99.8%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
FN432336	99.6%	100%	99.6%	100%		100%	100%	100%	99.6%	100%	100%	99.8%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
HQ389229	99.6%	100%	99.6%	100%	100%		100%	100%	99.6%	100%	100%	99.8%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
HQ683712	99.5%	100%	99.5%	100%	100%	100%		100%	99.5%	100%	100%	99.8%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
HQ844231	99.6%	100%	99.6%	100%	100%	100%	100%		99.6%	100%	100%	99.8%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
JN128897	99.2%	99.6%	99.2%	99.6%	99.6%	99.6%	99.5%	99.6%		99.6%	99.5%	99.3%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%
JN128898	99.6%	100%	99.6%	100%	100%	100%	100%	100%	99.6%		100%	99.8%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
JN590055	99.5%	100%	99.5%	100%	100%	100%	100%	100%	99.5%	100%		99.8%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
JN590056	99.3%	99.8%	99.3%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.3%	99.8%	99.8%		99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%
JQ342247	99.6%	100%	99.6%	100%	100%	100%	100%	100%	99.6%	100%	100%	99.8%		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
KC503915	99.6%	100%	99.6%	100%	100%	100%	100%	100%	99.6%	100%	100%	99.8%	100%		100%	100%	100%	100%	100%	100%
KC632567	99.6%	100%	99.6%	100%	100%	100%	100%	100%	99.6%	100%	100%	99.8%	100%	100%		100%	100%	100%	100%	100%
KC998714	99.6%	100%	99.6%	100%	100%	100%	100%	100%	99.6%	100%	100%	99.8%	100%	100%	100%		100%	100%	100%	100%
KJ188203	99.6%	100%	99.6%	100%	100%	100%	100%	100%	99.6%	100%	100%	99.8%	100%	100%	100%	100%		100%	100%	100%
KJ188204	99.6%	100%	99.6%	100%	100%	100%	100%	100%	99.6%	100%	100%	99.8%	100%	100%	100%	100%	100%		100%	100%
KJ188205	99.6%	100%	99.6%	100%	100%	100%	100%	100%	99.6%	100%	100%	99.8%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		100%
KJ188206	99.6%	100%	99.6%	100%	100%	100%	100%	100%	99.6%	100%	100%	99.8%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	

Tablo 4.9. Kayseri yöresi *H. contortus* izolatları ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı *H. contortus* izolatların ITS-2 gen dizilimlerinin pairwise analizleri

Kayseri yöresinden elde edilen *H. contortus* izolatları ile Dünya'da GenBank'a kayıtlı benzer diğer bazı izolatların, complete ITS-2 gen bölgelerinin multiple alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.21'de gösterilmiştir.

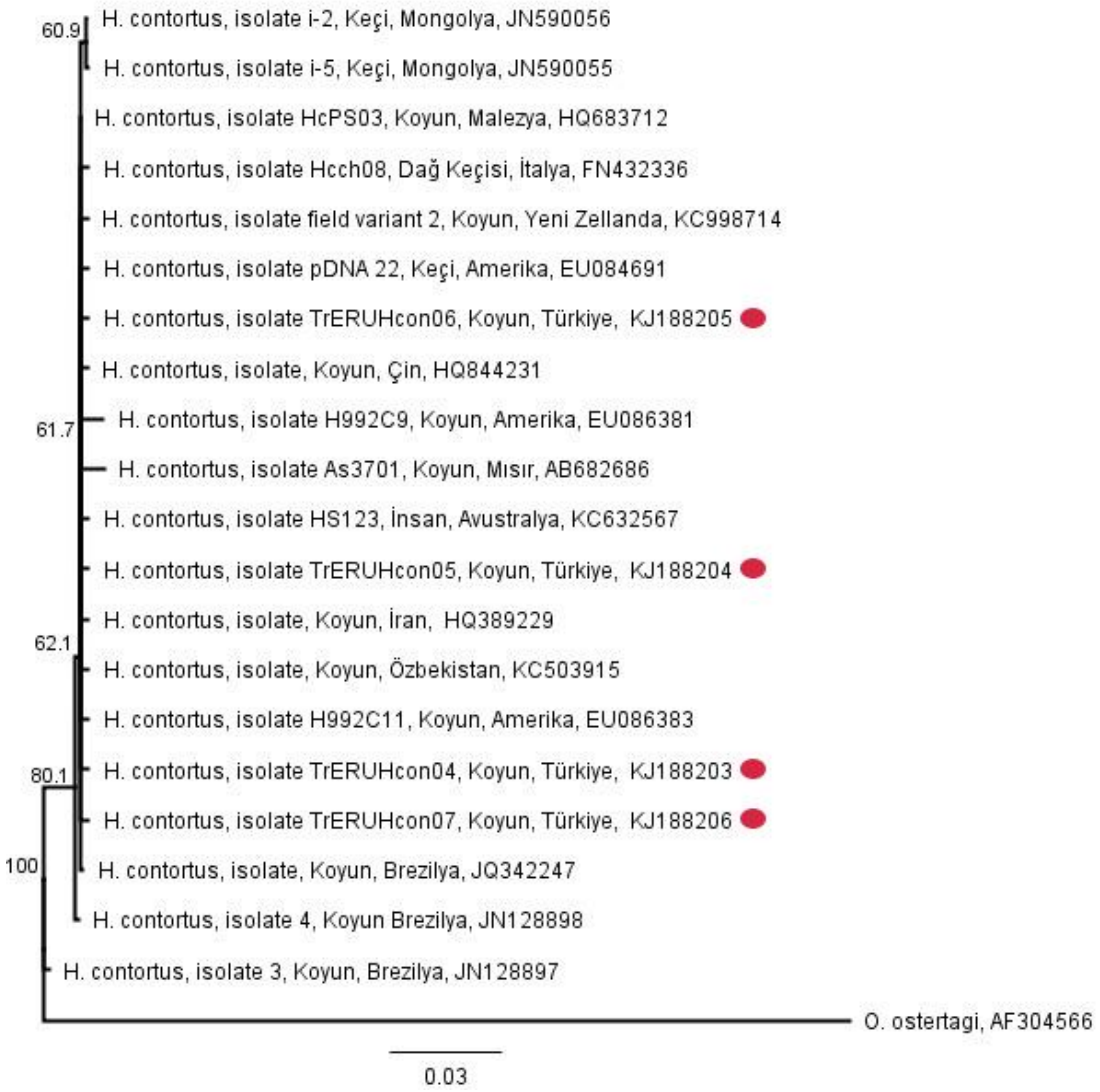




Şekil 4.21. Kayseri yöresinde koyunlarda belirlenen *H. contortus* izolatları ile Dünyadaki diğer bazı *H. contortus* izolatlarının complete ITS-2 gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları

Araştırma yöresinde complete ITS-2 nükleotid sekansları ortaya TrERUHcon04, TrERUHcon05, TrERUHcon06 ve TrERUHcon07 izolatların pairwise analizleri sonucu %100,0 identik oldukları belirlenmiştir (Tablo 4.9). Ayrıca *H. contortus* Kayseri izolatlarının Dünyanın farklı bölgelerinden GenBank'a kayıtlı benzer izolatlarla ortalama %0,1 genetik farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Kayseri *H. contortus* TrERUHcon04, TrERUHcon05, TrERUHcon06 ve TrERUHcon07 izolatları Brezilya (JN128898, JQ342247), Çin (HQ844231), İran (HQ389229), Özbekistan (KC503915),

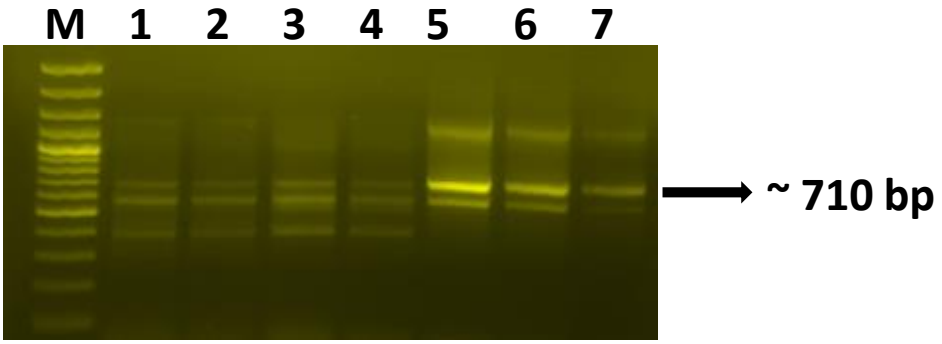
Yeni Zellanda (KC998714), Amerika (EU086383) ve Malzeya'da (HQ683712) koyunlardan, İtalya (FN432336) ve Amerika'da (EU084691) keçilerden, Avustralya'da bir insan dışkısından (KC632567) izole edilmiş izolatlarla %100,0 identik bulunurken Brezilya (JN128897), Mısır (AB682686) ve Amerika'da (EU086381) koyunlardan elde edilmiş izolatlarla %0,4; Mongolya'da keçilerden izole edilmiş iki izolatla sırasıyla %0,5 (JN590055) ve %0,7 (JN590056) genetik farklılık göstermiştir (Şekil 4.21). Bu sonuçlarla Neighbor Joining Metodu (Tamura Nei Modeli, Bootstrap 1000) ile oluşturulan filogenetik ağaçta (Şekil 4.22) görüleceği üzere *H. contortus* Kayseri izolatları ITS-2 gen bölgesine göre identik oldukları diğer izolatlarla birlikte aynı filogenetik branşta yer almış ve dolayısıyla aynı genotipte oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.22. Kayseri yöresinde saptanan *H. contortus* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların complete ITS-2 gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Neighbour Joining – Tamura Nei modeli, Boostrap:1000). ● : Kayseri izolatları; Dış grup olarak *O. ostertagi* (AF304566) kullanılmıştır. Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir

4.6. Mitokondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 Geninin Amplifikasyonu

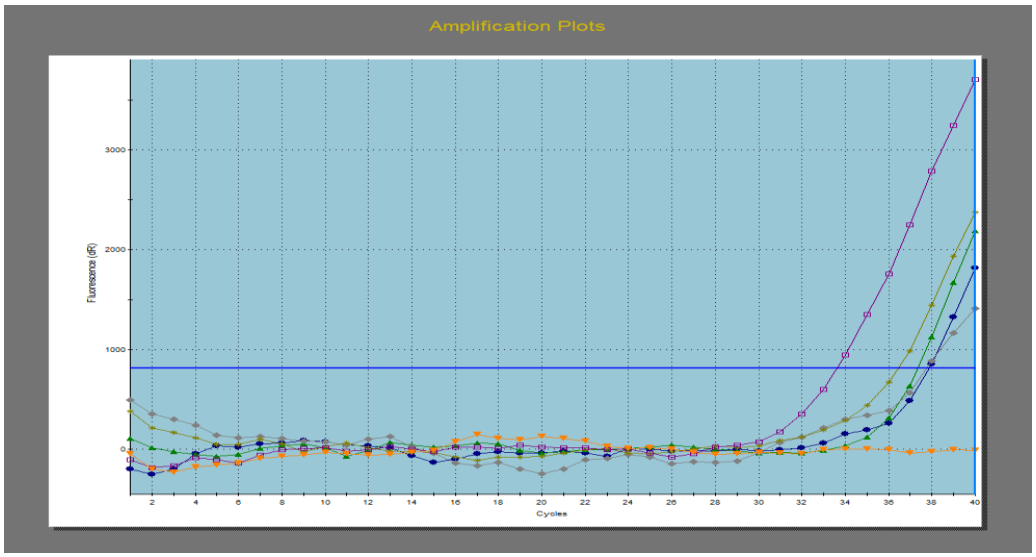
Real Time PCR analizlerinde *H. contortus* pozitif belirlenen örneklerin mt-COI gen bölgesinin PCR analizleri sonucunda Ct (dR) değerleri 36'nın altında bulunan toplam 32 örneğin farklı konsantrasyonlarda jel üzerinde 710 bp büyüklüğünde amplifikasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bazı pozitif izolatlarda mt-COI gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonların %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.23'de verilmiştir.



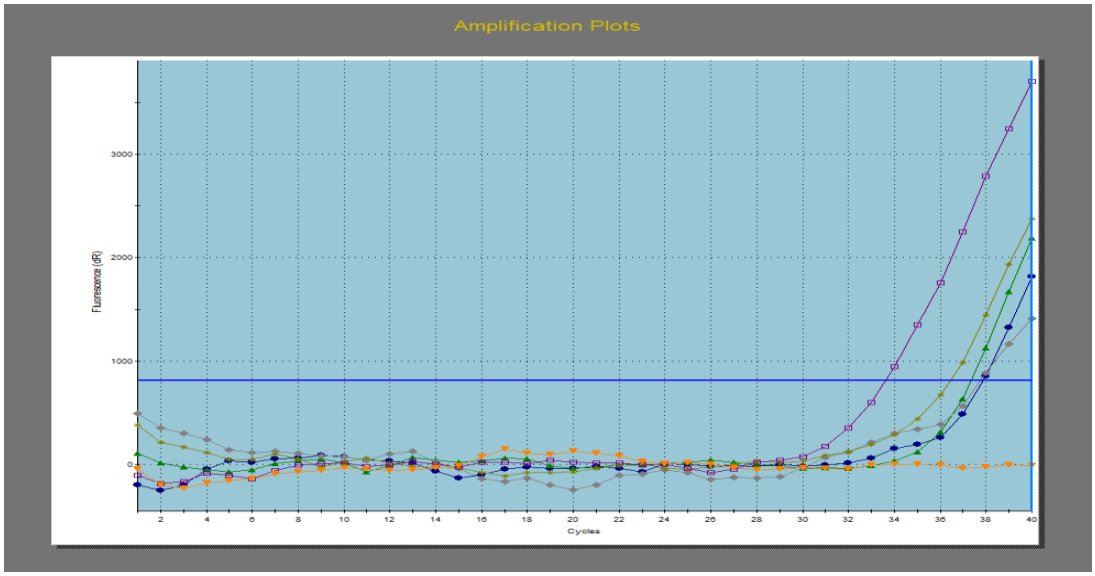
Şekil 4.23. *H. contortus* pozitif izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 1-7: Pozitif izolatlar

4.7. Beta Tubulin İzotip-1 Geninde Tek Nükleotid Polimorfizminin (SNP) Real Time PCR ile Analiz Sonuçları

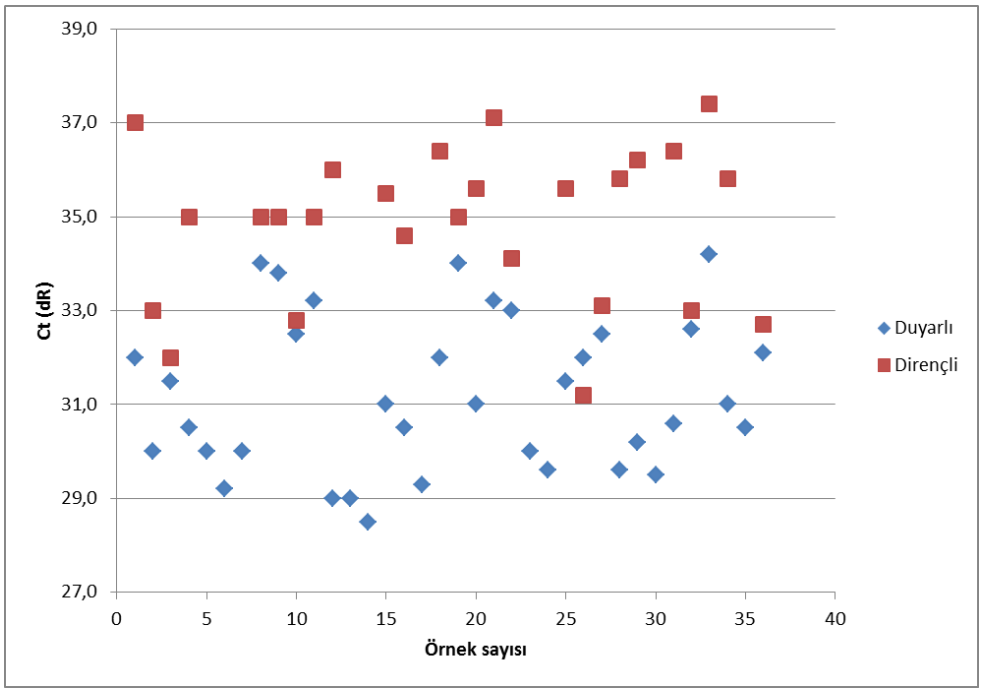
β tubulin izotip-1 gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacıyla *H. contortus*'un benzimidazol duyarlı ve dirençli alellerin kantitatif amplifikasyonu için TaqMan prob bazlı Real time PCR analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri sırasıyla Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'de verilmiştir. İncelenen koyunlarda benzimidazol dirençliliği yönünden saptanan Ct (dR) değerleri ile duyarlı ve dirençli allel sıklıkları Tablo 4.10'da ve grafik üzerinde Şekil 4.26'da gösterilmiştir. Tablo 4.10'da görüleceği üzere incelenen koyunlarda β tubulin izotip-1 gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmine göre benzimidazol dirençliliği açısından duyarlı allel sıklığı %87,12±16,19 belirlenirken dirençli allel sıklığı ise %12,88±16,19 olarak tespit edilmiştir. Ct (dR) değerlerine göre göre belirlenen duyarlı ve dirençli allel sıklıklarının istatistiksel analizi Tablo 4.11'de verilmiş olup duyarlı alell sıklığının dirençli allel sıklığına oranla yaklaşık 7 kat yüksek olduğu belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,001$). Araştırma merkezlerinde *H. contortus* pozitif saptanan koyunlarda Benzimidazol dirençliliği yönünden allel sıklıkları ayrıca Şekil 4.27'de verilmiştir.



Şekil 4.24. TaqMan prob Real Time PCR analizleri sonucu *H. contortus* duyarlı allellerin amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.25. TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizleri sonucu *H. contortus* dirençli allellerin amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.26. Real Time PCR'da β tubulin izotip-1 gen bölgesine göre benzimidazol duyarlı ve dirençli *H. contortus* nesillerinin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı.

Tablo 4.10. *H. contortus* pozitif örneklerde benzimidazol dirençliliği yönünden Real Time PCR ile belirlenen eşik döngü değerleri [Ct (dR)] ve allel sıklıkları

Örnek sayısı	Eşik döngü değeri [Ct (dR)]		Allel sıklığı (%)	
	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
1	32,0	37,0	96,97	3,03
2	30,0	33,0	88,89	11,11
3	31,5	32,0	58,58	41,42
4	30,5	35,0	95,76	4,24
5	30,0	0,0	100,00	0,00
6	29,2	0,0	100,00	0,00
7	30,0	0,0	100,00	0,00
8	34,0	35,0	66,67	33,33
9	33,8	35,0	69,68	30,32
10	32,5	32,8	55,17	44,83
11	33,2	35,0	77,68	22,32
12	29,0	36,0	99,22	0,78
13	29,0	0,0	100,00	0,00
14	28,5	0,0	100,00	0,00
15	31,0	35,5	95,76	4,24
16	30,5	34,6	94,48	5,52
17	29,3	0,0	100,00	0,00

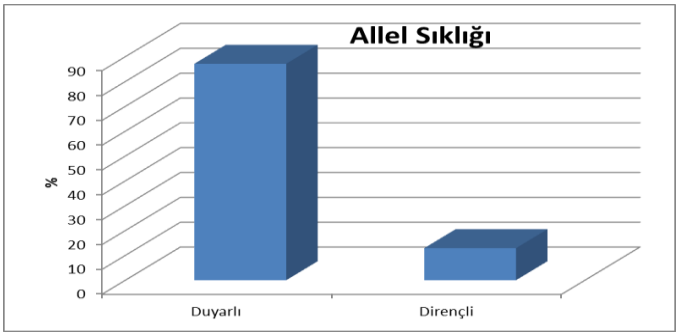
Tablo 4.10. *H. contortus* pozitif örneklerde benzimidazol dirençliliği yönünden Real Time PCR ile belirlenen eşik döngü değerleri [Ct (dR)] ve allel sıklıkları **(Devamı)**

Örnek sayısı	Eşik döngü değeri [Ct (dR)]		Allel sıklığı (%)	
	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
18	32,0	36,4	95,47	4,53
19	34,0	35,0	66,67	33,33
20	31,0	35,6	96,04	3,96
21	33,2	37,1	93,72	6,28
22	33,0	34,1	68,19	31,81
23	30,0	0,0	100,00	0,00
24	29,6	0,0	100,00	0,00
25	31,5	35,6	94,48	5,52
26	32,0	31,2	63,52	36,48
27	32,5	33,1	60,25	39,75
28	29,6	35,8	98,65	1,35
29	30,2	36,2	98,46	1,54
30	29,5	0,0	100,00	0,00
31	30,6	36,4	98,23	1,77
32	32,6	33,0	56,89	43,11
33	34,2	37,4	90,18	9,82
34	31,0	35,8	96,53	3,47
35	30,5	0,0	100,00	0,00
36	32,1	32,7	60,25	39,75
Ortalama±St.Sp	31,20±1,62	34,86±1,65	87,12±16,19	12,88±16,19

Tablo 4.11. Benzimidazol duyarlı ve dirençli allel sıklıklarının istatistiksel analizi

Faktör	Allel Sıklığı (%)				F	P
	Ortalama	Std. Sapma	Min	Max		
Duyarlı	87,12	16,19	55,17	100,00	378,404	0,000
Dirençli	12,88	16,19	0,00	44,83		

F: Anova testi



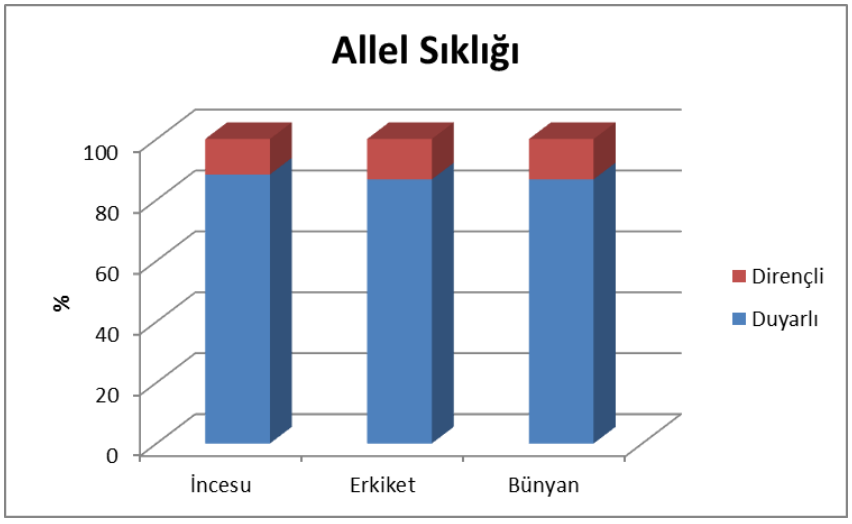
Şekil 4.27. Araştırma yöresinde benzimidazol duyarlı ve dirençli *H. contortus* nesillerinin allel sıklıklarına göre dağılımı

H. contortus pozitif belirlenen koyunlarda benzimidazol dirençliliği allel sıklıklarının koyunların yaş grupları, cinsiyet ve araştırma merkezlerine göre dağılımı Tablo 4.12'de verilmiştir. Her iki allel grubu için de araştırma bölgesi, yaş grupları ve cinsiyete göre istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Duyarlı ve dirençli allel sıklıklarının araştırma merkezleri, koyunların yaş ve cinsiyetlerine göre dağılımı grafik üzerinde sırasıyla Şekil 4.28-Şekil 4.30'da gösterilmiştir.

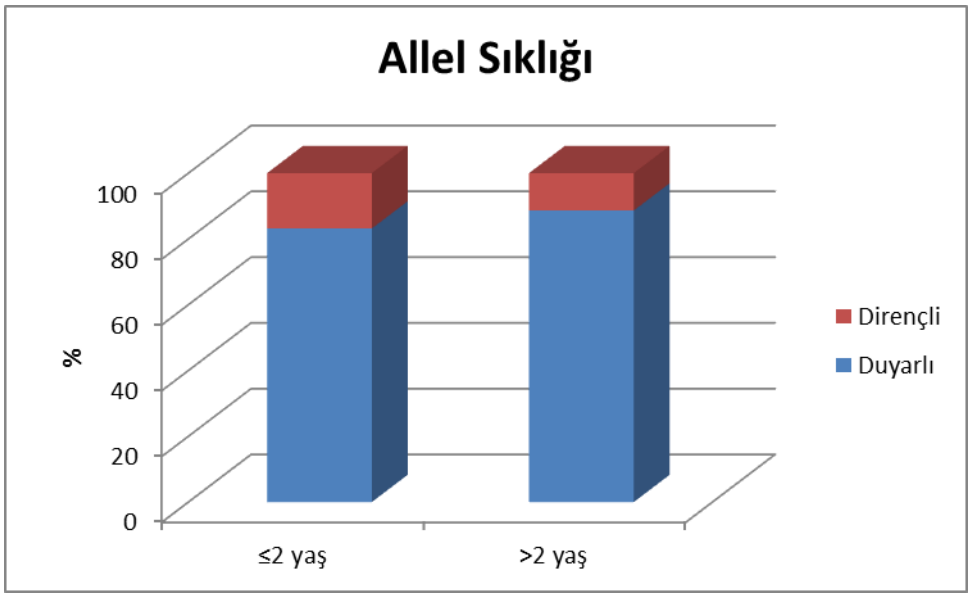
Tablo 4.12. Real Time PCR ile benzimidazol duyarlı *H. contortus* nesillerinde saptanan Ct (dR) değerlerinin araştırma bölgesi, yaş grupları ve cinsiyete göre dağılımı ve istatistiksel analizleri

Faktör	Allel Sıklığı (%)					
	Duyarlı		Dirençli		F	P
	Min-Max	Ortalama+St.Sp	Min-Max	Ortalama+St.Sp		
Araştırma bölgesi						
İncesu	58,58-100,00	88,36±16,44	0,00-41,42	11,64±16,44	0,28	0,972
Erkilet	55,17-100,00	86,74±16,35	0,00-44,83	13,26±16,35		
Bünyan	56,89-100,00	86,79±16,95	0,00-43,11	13,21±16,95		
Yaş (yıl)						
≤2	55,17-100,00	83,17±18,48	0,00-44,83	16,83±18,48	0,820	0,372
>2	56,89-100,0	88,64±15,34	0,00-43,11	11,36±15,34		
Cinsiyet						
Erkek	55,17-100,00	81,78±23,57	0,00-43,11	18,22±23,57	0,349	0,559
Dişi	56,89-100,00	87,61±15,78	0,00-44,83	12,39±15,78		

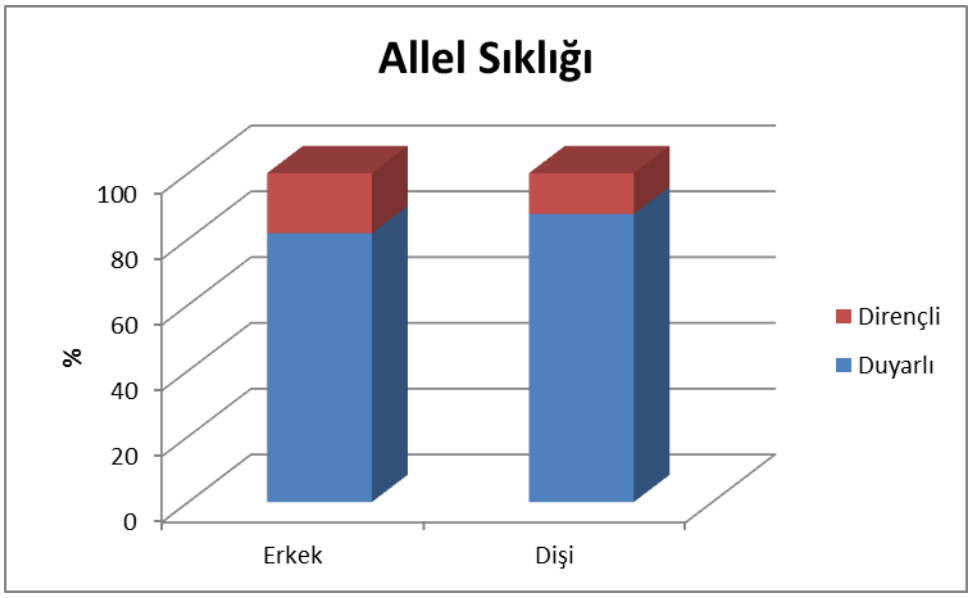
F: Anova Testi



Şekil 4.28. Benzimidazol duyarlı ve dirençli allel sıklıklarının araştırma merkezlerine göre dağılımı



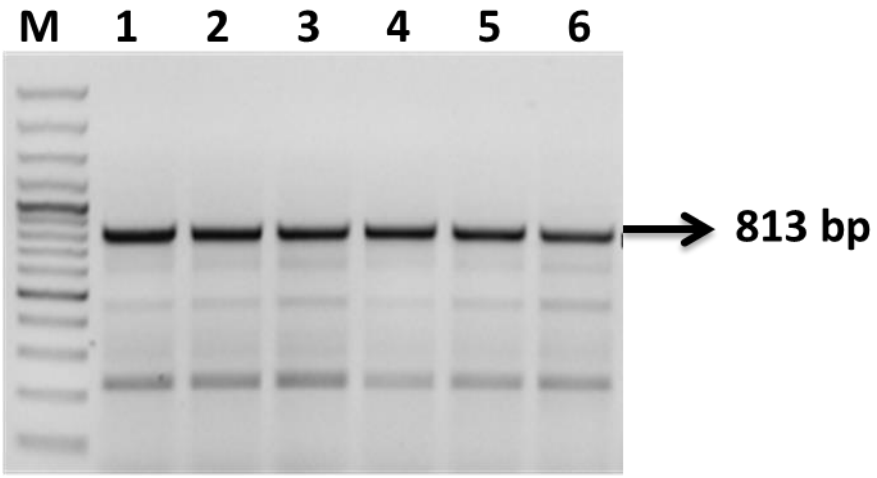
Şekil 4.29. Benzimidazol duyarlı ve dirençli allel sıklıklarının yaş gruplarına göre dağılımı



Şekil 4.30. Benzimidazol duyarlı ve dirençli allel sıklıklarının cinsiyete göre dağılımı

4.8. β tubulin izotip-1 Geninin Amplifikasyon Sonucu

Real time PCR'da duyarlı allel sıklığı %100 (9 izolat), dirençli alleller sıklığı >%39 (5 izolat) belirlenen toplam 14 izolatın β tubulin izotip-1 genini amplifiye eden HcTub-s5 ve HcTub-as5 primerleri ile PCR amplifikasyonu sonucu tüm örneklerde 813 bp amplikonların oluştuğu belirlenmiştir. Bazı örneklere ait amplikonların %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.31'de verilmiştir. Şekil 4.31'de görüleceği üzere hedef gen bölgesinin yanında ilgili primerlerin bazı non-spesifik bağlanmalar da gösterdiği belirlenmiştir.

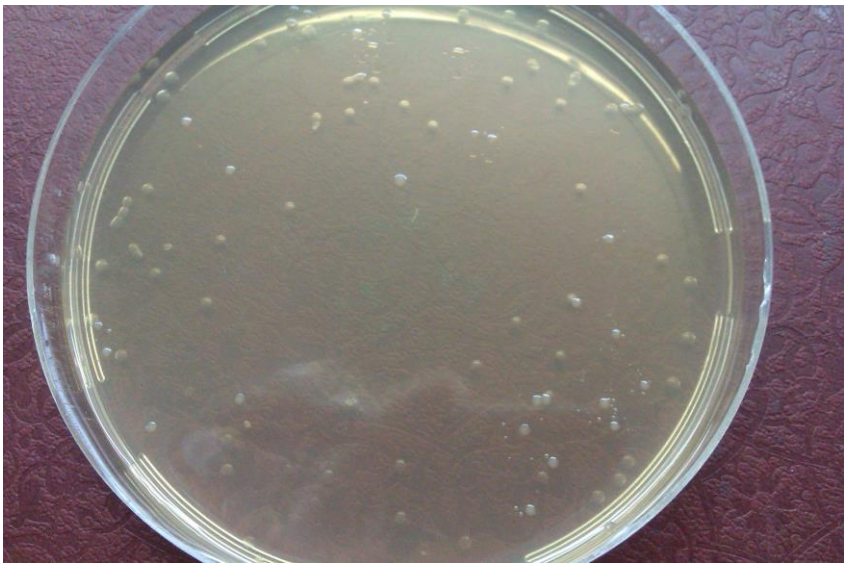


Şekil 4.31. *H. contortus* izolatlarının β tubulin izotip-1 gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 1-3: Duyarlı allel sıklığı %100 belirlenen izolatlara ait amplikonlar; 4-6: Dirençli allel sıklığı >39 belirlenen izolatlara ait amplikonlar

4.9. Mt-COI ve β tubulin izotip-1 Gen Bölgelerinin Klonlama Sonuçları

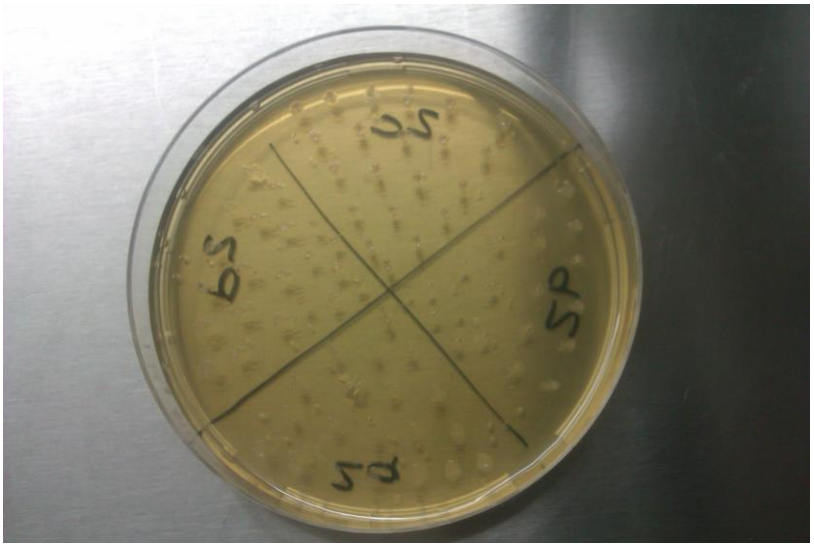
Araştırma yöresinde saptanan *H. contortus* nesillerinin mt-COI gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonu için üç, Real Time PCR analizlerinde β tubulin izotip-1 gen bölgelesine göre duyarlı ve dirençli alleller için de analiz edilen 14 izolat, sekansların kayıpsız elde edilebilmesi için klonlanmıştır. Bu amaçla ilgili izolatların PCR analizleri sonucu jel üzerinde belirlenen amplikonlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir.

Elde edilen jel pürifiye örnekler CloneJET PCR Clonning Kit (Thermo Scientific, USA) kullanılarak pJET1.2/blunt klonlama vektörüne insert edilmiştir. Daha sonra ligasyon ürünü *E. coli* TOP 10 kompetan hücrelere transforme edilniştir. Bir gece inkübasyon sonrası ampicylin LB besi yerinde oluşan koloniler Şekil 4.32'de gösterilmiştir.



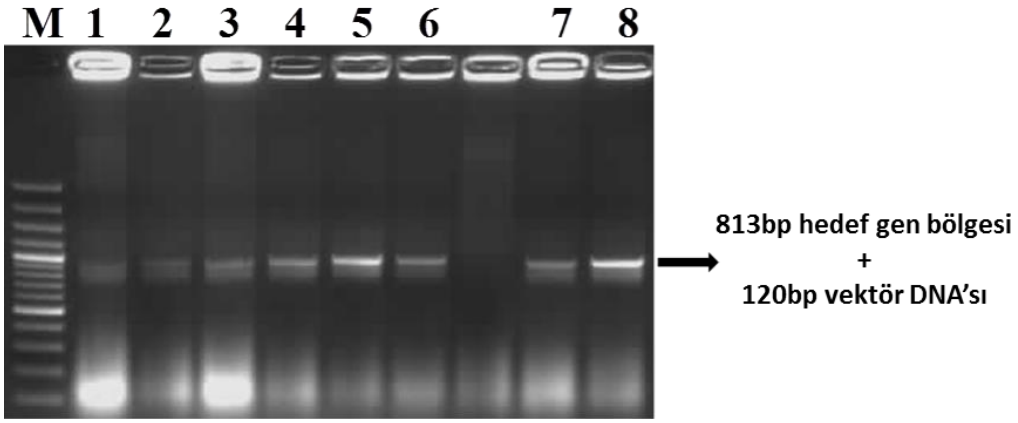
Şekil 4.32. Transformasyon sonucu besi yerinde oluşan koloniler

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerden seçilen tek koloniler, transformasyon etkinliğini artırmak amacıyla steril pipet uçları ile alınıp ayrı ayrı tekrar LB katı besiyerine ekilmiştir. Tekrar 37 ^{o}C'de 1 gece inkübe edilen kolonilerin katı besiyerinde görünümleri Şekil 4.33'de verilmiştir.

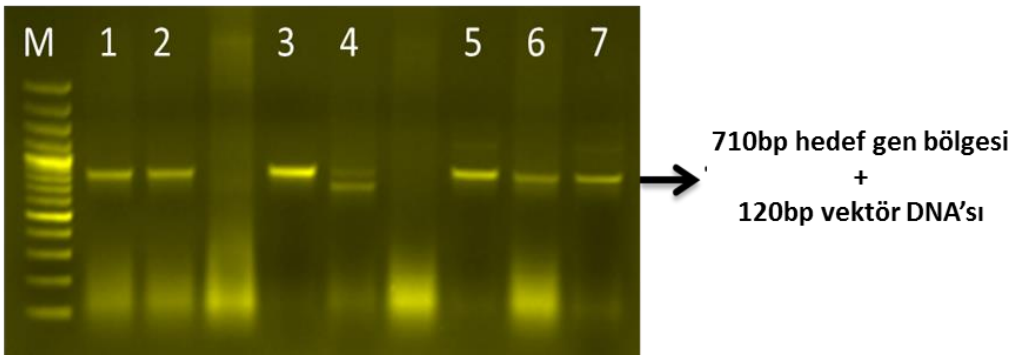


Şekil 4.33. Transformasyon basamağında 2. inkübasyon basamağı sonucu oluşan koloniler

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerde hedef gen bölgesinin vektöre insert olduğu ve transformasyon etkinliği vektör spesifik primerlerle koloni PCR yapılarak teyit edilmiştir. β tubulin izotip-1 ve mt-COI gen bölgelerinin koloni PCR sonuçları sırasıyla Şekil 4.34 ve Şekil 4.35'de gösterilmiş olup her iki gen bölgesine ait DNA'ların vektörlere başarılı bir şekilde insert olduğu görülmüştür.

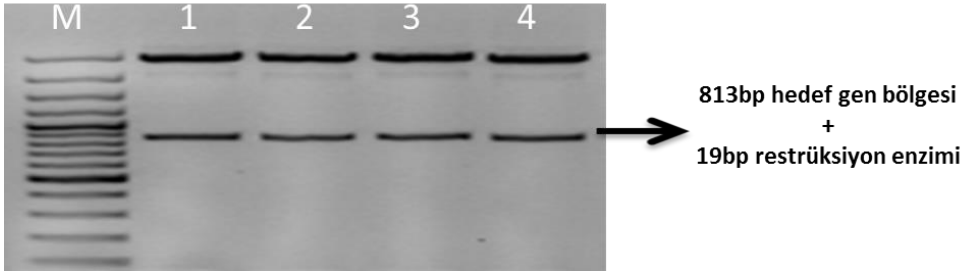


Şekil 4.34. Transforme hücrelerde β tubulin izotip-1 gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü. M: Marker (100bp); 1-8: İnsert β tubulin izotip-1 gen bölgesi

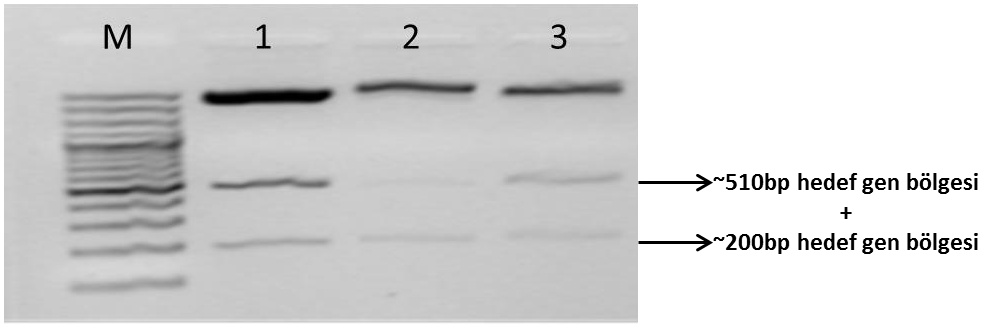


Şekil 4.35. Transforme hücrelerde mt-COI gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü. M: Marker (100bp); 1-7: İnsert mt-COI gen bölgesi

Koloni PCR sonuçlarını takiben ilgili gen bölgeleri yönünden pozitif saptanan tek bir koloni seçilerek sıvı besi yerine aktarılmış, bir gece 37°C'de inkubasyondan sonra üreyen tronsforme hücreler santrifüj ile çöktürülmüştür. Daha sonra transforme hücrelerden plasmid pürifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan rekombinant plazmidler, *Aval ve Xbal* (Thermo Scientific) restriksiyon enzimleri ile kesilerek klonlanan genin varlığı yönünden %1,5'luk jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.36 ve Şekil 4.37).



Şekil 4.36. Saflaştırılan plasmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu izolatların β tubulin izotip-1 gen bölgesine ait DNA'ların agaroz jelde görünümü. M-100 bp'lik marker; 1-2: Duyarlı allel sıklığı %100 belirlenen izolatlara ait insert DNA; 3-4: Dirençli allel sıklığı >39 belirlenen izolatlara ait insert DNA



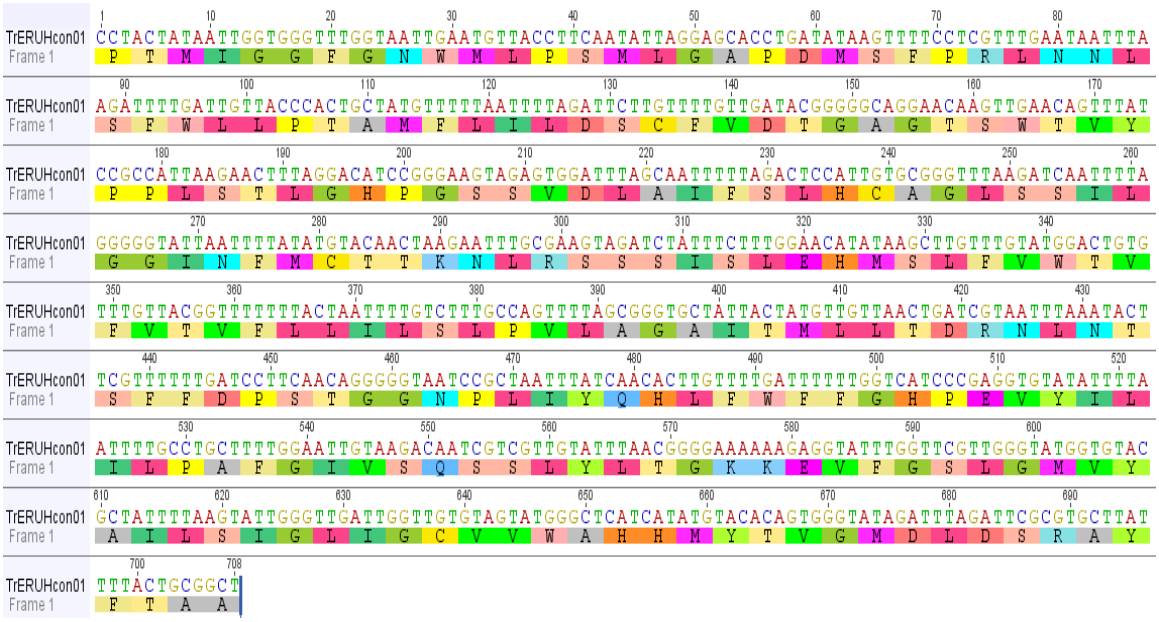
Şekil 4.37. Saflaştırılan plasmidlerin restrüksiyon enzimleri ile kesimi sonucu izolatların mt-COI gen bölgesine ait DNA'ların agaroz jelde görünümü. M-100 bp'lik marker; 1-3: *H. contortus* izolatları

4.10. Mt-COI Geninin Sekans ve Filogenetik Analizi

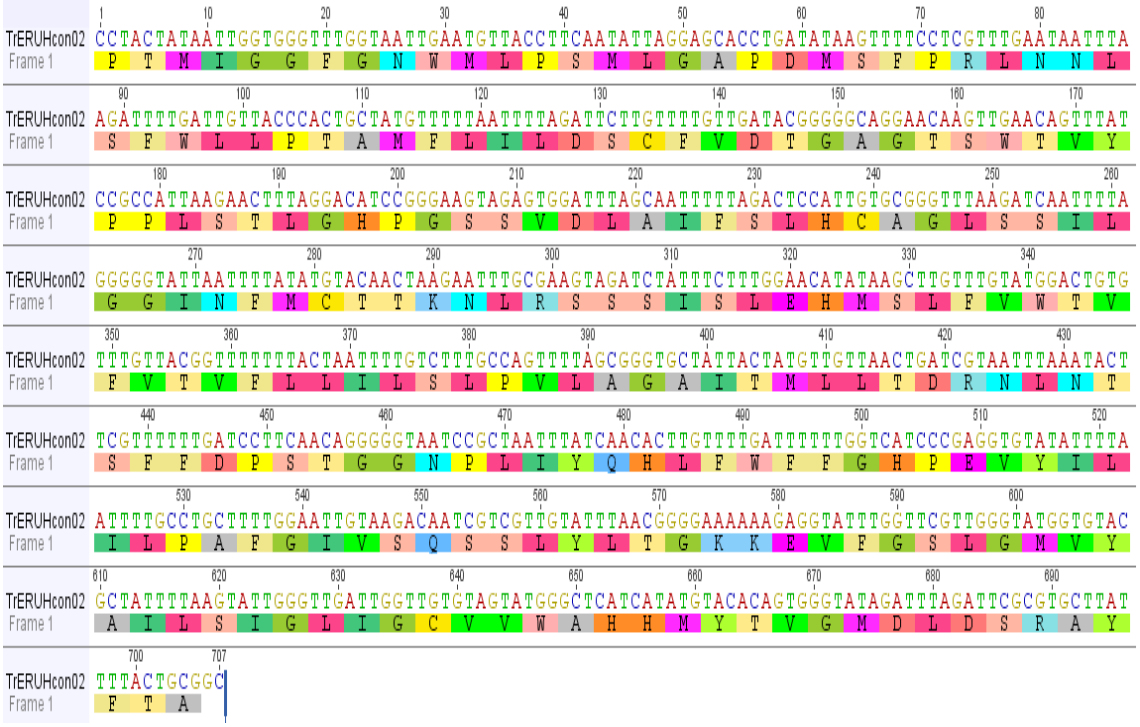
Mt-COI gen bölgesi yönünden elde edilen plasmidler, vektör spesifik primer çifti ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Elde edilen nükleotid dizileri vektör sekansı ile alignment yapılarak ilgili gen bölgesinin sekansları elde edilmiştir. Mt-COI gen bölgesi yönünden sekansları elde edilen izolatların, konak, izolasyon kaynağı, gelişim dönemi ve GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.13'de, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.38, 4.39 ve 4.40'da verilmiştir.

Tablo 4.13. Kayseri yöresinde koyunlarında belirlenen *H. contortus* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları

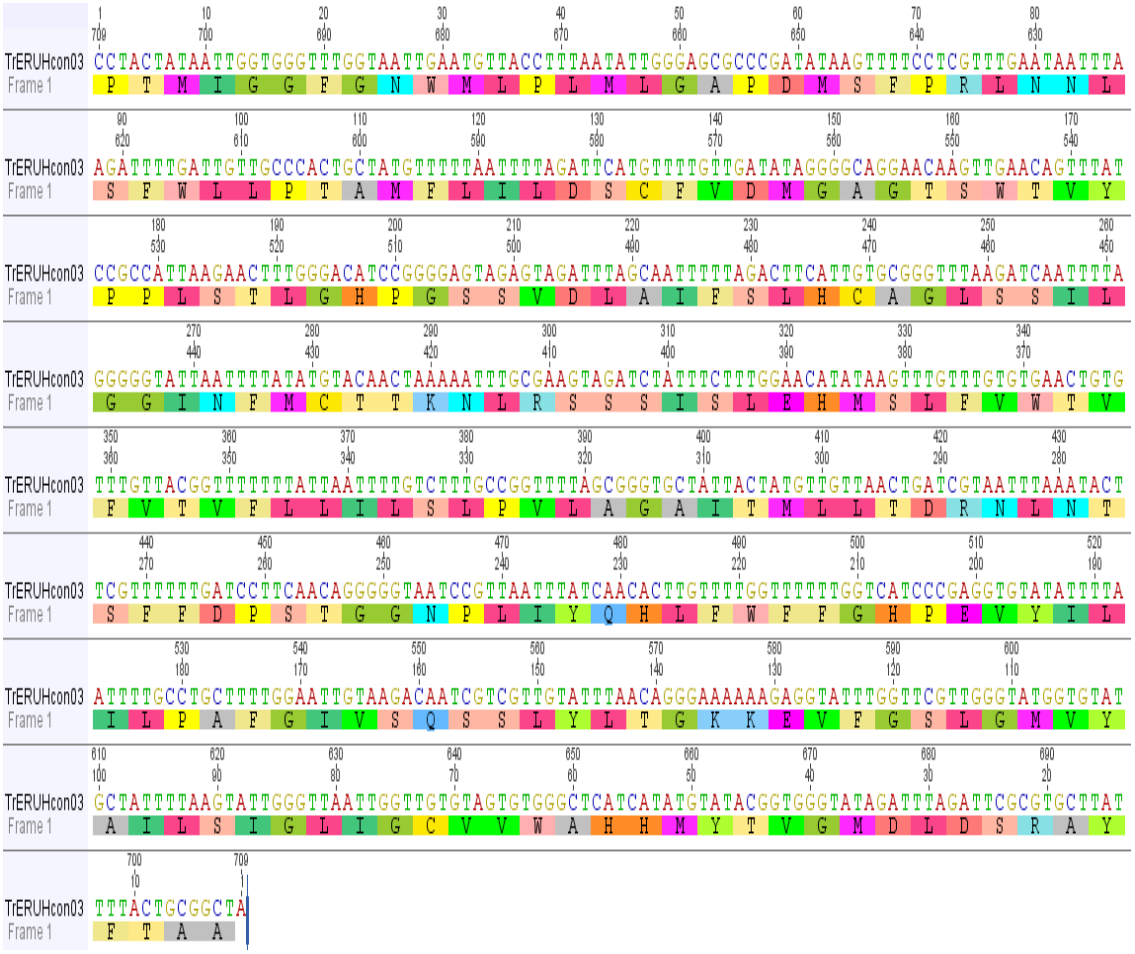
İzolat	Gen bölgesi	Konak	İzolasyon kaynağı	Gelişim dönemi	GenBank Aksesyon Numarası
TrERUHcon01	Mt-COI	Koyun	Dışkı	Yumurta	KJ188200
TrERUHcon02	Mt-COI	Koyun	Dışkı	Yumurta	KJ188201
TrERUHcon03	Mt-COI	Koyun	Dışkı	Yumurta	KJ188202



Şekil 4.38. TrERUHcon01 izolatının sekans dizilimleri (KJ188200)



Şekil 4.39. TrERUHcon02 izolatının sekans dizilimleri (KJ188201)



Şekil 4.40. TrERUHcon03 izolatının sekans dizilimleri (KJ188202)

Kayseri yöresinde koyunlardan elde edilen *H. contortus* izolatlarıyla mt-COI gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan Dünya'daki diğer nematodlara ait izolatların aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank veri tabanından alınarak Tablo 4.14'de gösterilmiştir.

Tablo 4.14. Kayseri yöresinde koyunlardan elde edilen *H. contortus* izolatlarıyla Dünyadan mt-COI gen bölgesi yönünden filogenetik kıyaslaması yapılan diğer nematodlara ait izolatların aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	Orijin	İzolasyon kaynağı	Gelişim dönemi	Aksesyon Numarası
Cooperia onchophora				
Hollanda	Japonya	Sığır	-	AY265417
AKIC1	Japonya	Koyun	Larva3	AB246076
HCHC3	Japonya	Koyun	Larva3	AB246069
HEBC2	Japonya	Koyun	Ergin	AB246083
HGSC3	Japonya	Koyu	Larva3	AB246066
Haemonchus contortus				
TrERUHcon01	Türkiye	Koyun	Ergin	KJ188200
TrERUHcon02	Türkiye	Koyun	Ergin	KJ188201
TrERUHcon03	Türkiye	Koyun	Yumurta	KJ188202
-	Amerika	Koyun	-	HCU57033
-	Avustralya	Koyun	-	EU346694
Mecistocirrus digitatus				
PHLM20	Filipinler	Koyun	Ergin	AB245055
PHLM21	Filipinler	Koyun	Ergin	AB245056
PHLM22	Filipinler	Koyun	Ergin	AB245057
Ostertagia ostertagi				
CHIO4	Japonya	Sığır	Larva3	AB246104
HBKO3	Japonya	Sığır	Ergin	AB246113
HEBO3	Japonya	Sığır	Ergin	AB246110
HHMO11	Japonya	Sığır	Larva3	AB246097
HHMO7	Japonya	Sığır	Larva3	AB246096
OKAO1	Japonya	Sığır	Larva3	AB246106
IWAO2	Japonya	Sığır	Larva3	AB246101
HKSO5	Japonya	Sığır	Larva3	AB246100
Trichostrongylus axei				
-	Avustralya	Koyun	-	GQ888719
Teladorsagia circumcincta				
-	Avustralya	Koyun	-	GQ888720

Kayseri yöresinde koyunlarda belirlenen ve nükleotid dizisi ortaya konan *H. contortus* izolatları ile Dünyanın çeşitli ülkelerinden multiple alignmenta dahil edilen diğer izolatların mt-COI gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Tablo 4.15'de, pairwise alignmentları ise Tablo 16'da verilmiştir.

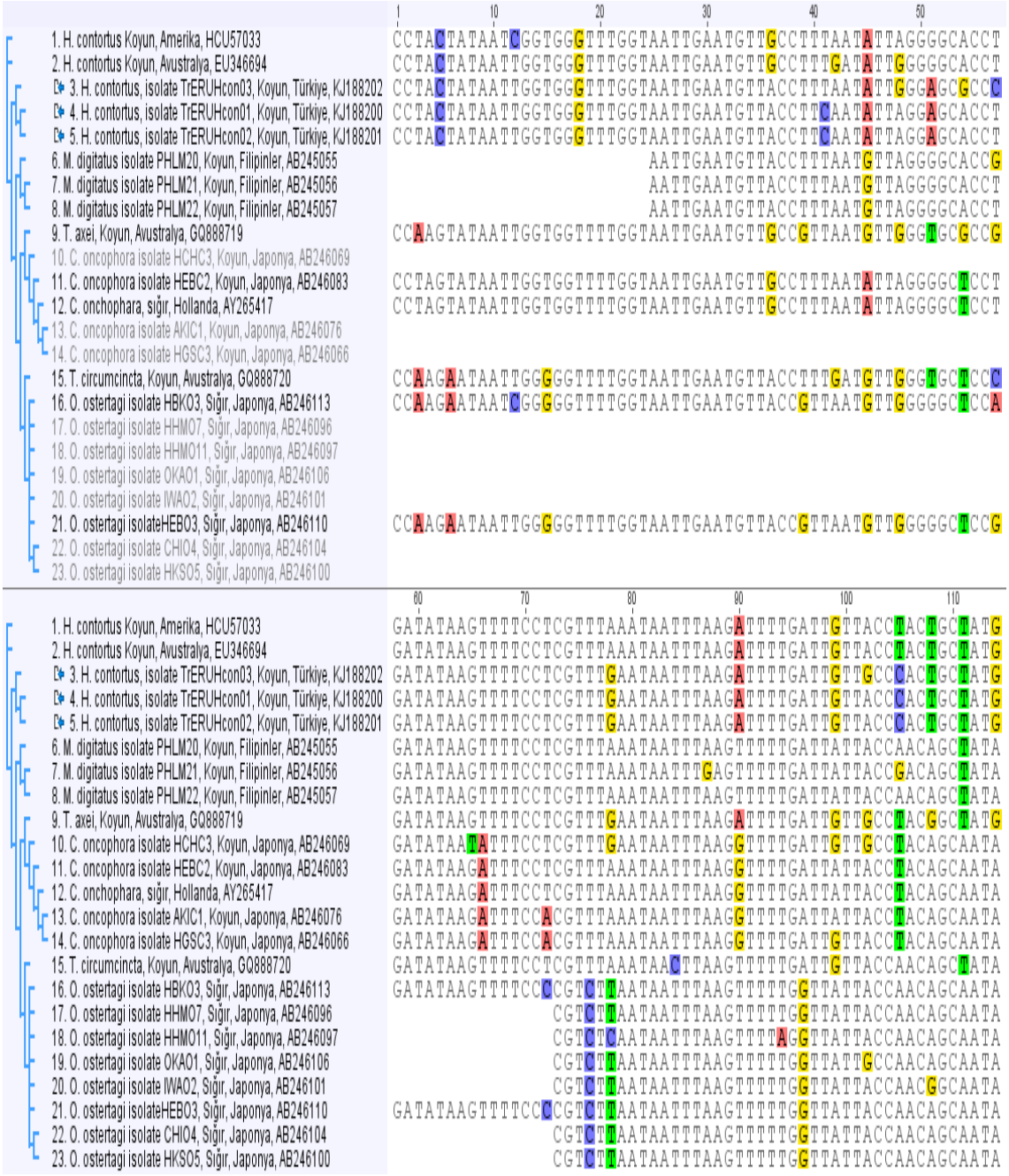
Tablo 4.15. Mt-COI gen bölgesi yönünden multiple alignmentları yapılan izolatların nükleotid kompozisyonları

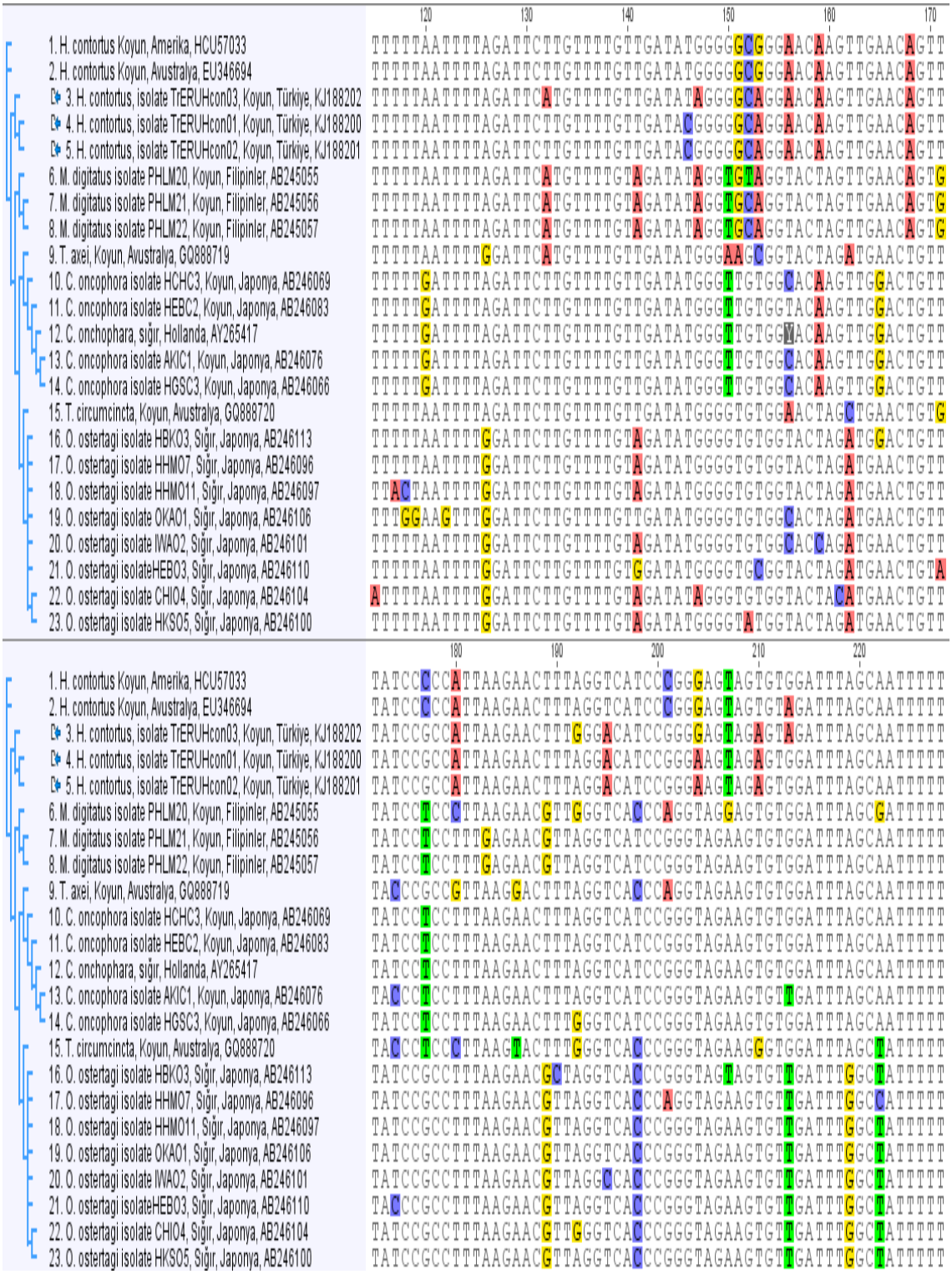
İzolat Aksesyon No	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)	Toplam nükleotid sayısı
AB246076	45,1	11,0	24,5	19,3	69,6	30,4	652,0
AB246104	42,4	12,4	22,3	22,9	64,7	35,3	637,0
AB246113	42,2	12,4	22,3	23,1	64,5	35,5	709,0
AB246069	45,2	10,7	24,1	19,9	69,3	30,7	652,0
AB246083	45,1	11,0	23,7	20,2	68,8	31,2	709,0
AB246110	42,0	12,3	22,7	23,0	64,7	35,3	709,0
AB246066	45,1	10,9	24,2	19,8	69,3	30,7	652,0
AB246097	41,9	12,7	22,6	22,8	64,5	35,5	637,0
AB246096	42,2	12,9	22,6	22,3	64,8	35,2	637,0
AB246100	42,2	12,9	22,1	22,8	64,4	35,6	637,0
AB246101	42,7	12,4	22,4	22,4	65,1	34,9	637,0
HCU57033	42,0	12,8	24,9	20,4	66,9	33,1	486,0
EU346694	41,7	12,1	24,7	21,4	66,4	33,6	709,0
GQ888719	41,7	11,3	24,4	22,6	66,1	33,9	709,0
GQ888720	42,5	12,8	23,7	21,0	66,1	33,9	709,0
AB246106	42,1	12,6	22,0	23,4	64,1	35,9	637,0
AB245055	41,9	11,4	25,4	21,3	67,3	32,7	685,0
AB2450561	42,0	11,8	25,1	21,0	67,2	32,8	685,0
AB245057	41,9	11,7	25,4	21,0	67,3	32,7	685,0
AY265417	45,0	10,9	23,9	20,2	68,9	31,1	704,0
KJ188200	40,5	12,9	24,3	22,3	64,8	35,2	708,0
KJ188201	40,5	12,9	24,3	22,3	64,8	35,2	707,0
KJ188202	41,3	11,8	24,0	22,8	65,3	34,7	709,0
Ortalama	42,6	12,0	23,7	21,7	66,3	33,7	669,6

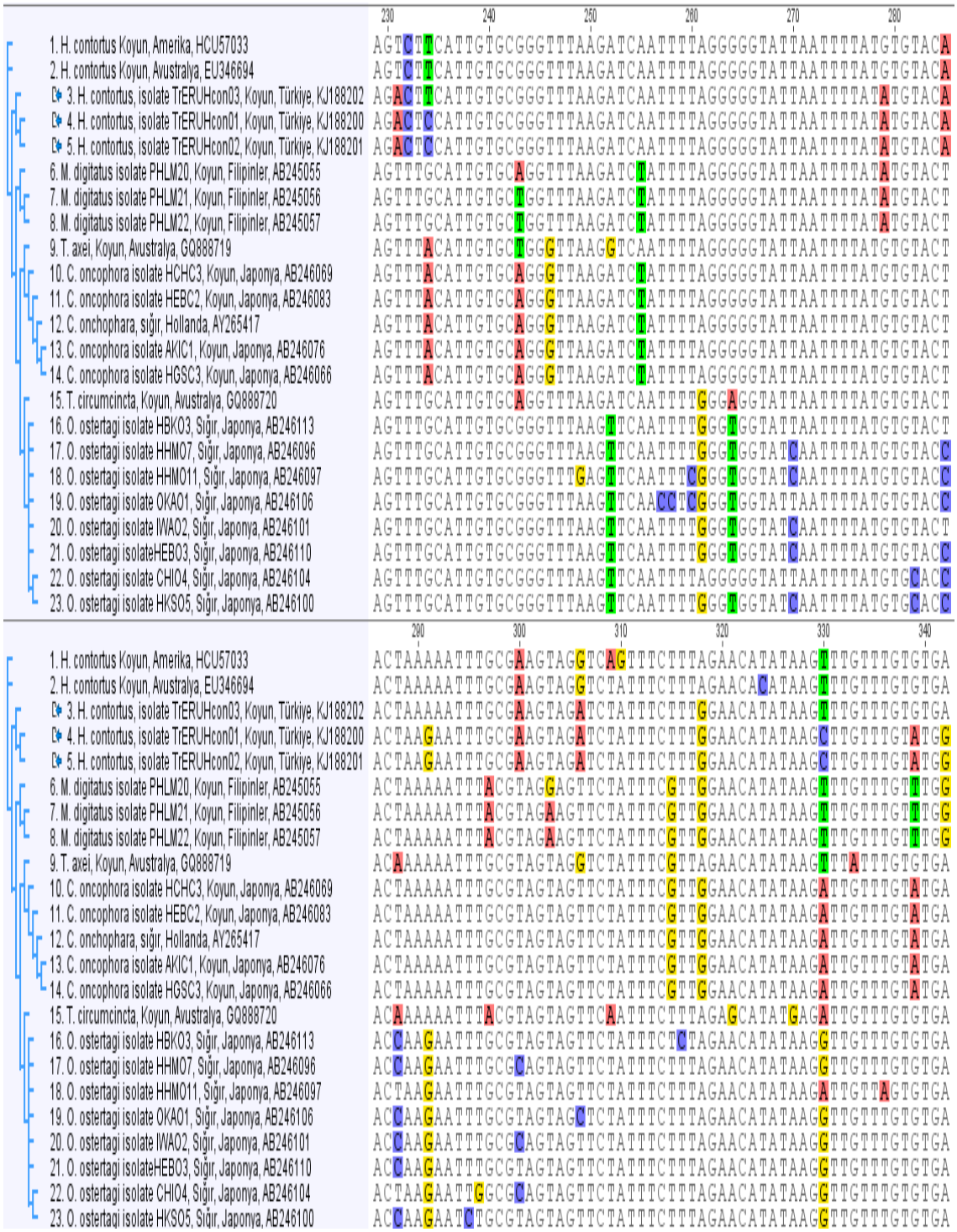
	AB245056	AB245057	AB245055	AB246096	AB246097	AB246100	AB246104	AB246113	AB246106	AB246101	AB246110	GQ888720	AB246066	AB246076	AY265417	AB246083	AB246069	GQ888719	KJ188200	KJ188201	KJ188202	EU346694	HCU57033
AB245056		99.3%	96.5%	84.8%	84.1%	84.3%	84.0%	85.0%	84.0%	84.5%	85.5%	86.0%	87.7%	87.7%	88.3%	88.3%	88.3%	87.0%	87.1%	87.3%	87.3%	87.0%	87.2%
AB245057	99.3%		96.9%	85.4%	84.6%	84.9%	84.6%	85.5%	84.6%	85.1%	86.1%	86.4%	88.0%	88.0%	88.6%	88.6%	88.7%	87.4%	87.6%	87.7%	87.7%	87.4%	87.7%
AB245055	96.5%	96.9%		85.9%	84.9%	85.1%	85.4%	86.1%	84.9%	85.6%	86.4%	87.2%	88.0%	87.7%	88.1%	88.0%	88.2%	87.4%	86.7%	86.8%	87.6%	87.6%	86.8%
AB246096	84.8%	85.4%	85.9%		96.7%	96.7%	95.4%	96.4%	96.2%	96.7%	97.0%	87.8%	86.3%	86.7%	86.9%	87.1%	87.0%	86.0%	84.7%	84.9%	85.2%	86.2%	84.8%
AB246097	84.1%	84.6%	84.9%	96.7%		95.9%	95.0%	96.2%	95.4%	94.7%	96.2%	87.4%	86.2%	86.5%	86.5%	86.8%	86.8%	85.2%	84.1%	84.3%	84.9%	84.8%	83.3%
AB246100	84.3%	84.9%	85.1%	96.7%	95.9%		96.2%	96.9%	95.3%	95.9%	97.5%	87.6%	86.2%	86.5%	86.5%	86.8%	86.8%	85.2%	84.3%	84.3%	85.4%	84.9%	83.8%
AB246104	84.0%	84.6%	85.4%	95.4%	95.0%	96.2%		96.1%	94.3%	95.0%	95.9%	87.6%	86.5%	86.5%	86.5%	87.1%	86.8%	85.4%	84.3%	84.3%	85.7%	84.9%	83.6%
AB246113	85.0%	85.5%	86.1%	96.4%	96.2%	96.9%	96.1%		95.9%	96.2%	97.2%	88.9%	87.3%	87.6%	87.3%	87.9%	87.7%	86.5%	84.6%	84.6%	85.6%	85.3%	84.2%
AB246106	84.0%	84.6%	84.9%	96.2%	95.4%	95.3%	94.3%	95.9%		95.8%	96.1%	87.6%	86.5%	86.8%	86.8%	86.8%	87.4%	85.6%	84.4%	84.4%	85.6%	85.2%	83.3%
AB246101	84.5%	85.1%	85.6%	96.7%	94.7%	95.9%	95.0%	96.2%	95.8%		96.5%	88.2%	86.7%	87.0%	86.9%	87.4%	87.3%	86.5%	84.7%	84.7%	85.7%	86.7%	84.5%
AB246110	85.5%	86.1%	86.4%	97.0%	96.2%	97.5%	95.9%	97.2%	96.1%	96.5%		89.3%	87.1%	87.7%	87.3%	87.3%	87.6%	86.9%	85.3%	85.3%	85.8%	85.8%	84.0%
GQ888720	86.0%	86.4%	87.2%	87.8%	87.4%	87.6%	87.6%	88.9%	87.6%	88.2%	89.3%		89.0%	88.5%	88.1%	88.3%	88.7%	87.7%	85.2%	85.1%	86.0%	86.6%	85.6%
AB246066	87.7%	88.0%	88.0%	86.3%	86.2%	86.2%	86.5%	87.3%	86.5%	86.7%	87.1%	89.0%		99.1%	99.0%	98.8%	98.5%	89.0%	86.2%	86.2%	86.7%	86.8%	87.2%
AB246076	87.7%	88.0%	87.7%	86.7%	86.5%	86.5%	86.5%	87.6%	86.8%	87.0%	87.7%	88.5%	99.1%		99.0%	98.8%	98.2%	89.3%	85.9%	85.8%	86.2%	86.7%	86.5%
AY265417	88.3%	88.6%	88.1%	86.9%	86.5%	86.5%	86.5%	87.3%	86.8%	86.9%	87.3%	88.1%	99.0%	99.0%		99.4%	98.4%	88.9%	86.8%	86.8%	86.7%	87.3%	88.0%
AB246083	88.3%	88.6%	88.0%	87.1%	86.8%	86.8%	87.1%	87.9%	86.8%	87.4%	87.3%	88.3%	98.8%	98.8%	99.4%		98.2%	89.4%	86.4%	86.4%	86.7%	87.3%	88.1%
AB246069	88.3%	88.7%	88.2%	87.0%	86.8%	86.8%	86.8%	87.7%	87.4%	87.3%	87.6%	88.7%	98.5%	98.2%	98.4%	98.2%		90.0%	86.8%	86.8%	87.3%	86.8%	87.2%
GQ888719	87.0%	87.4%	87.4%	86.0%	85.2%	85.2%	85.4%	86.5%	85.6%	86.5%	86.9%	87.7%	89.0%	89.3%	88.9%	89.4%	90.0%		84.9%	85.0%	86.9%	87.2%	87.0%
KJ188200	87.1%	87.6%	86.7%	84.7%	84.1%	84.3%	84.3%	84.6%	84.4%	84.7%	85.3%	85.2%	86.2%	85.9%	86.8%	86.4%	86.8%	84.9%		100%	96.3%	92.5%	93.4%
KJ188201	87.3%	87.7%	86.8%	84.9%	84.3%	84.3%	84.3%	84.6%	84.4%	84.7%	85.3%	85.1%	86.2%	85.8%	86.8%	86.4%	86.8%	85.0%	100%		96.3%	92.5%	93.4%
KJ188202	87.3%	87.7%	87.6%	85.2%	84.9%	85.4%	85.7%	85.6%	85.6%	85.7%	85.8%	86.0%	86.7%	86.2%	86.7%	86.7%	87.3%	86.9%	96.3%	96.3%		93.7%	93.6%
EU346694	87.0%	87.4%	87.6%	86.2%	84.8%	84.9%	84.9%	85.3%	85.2%	86.7%	85.8%	86.6%	86.8%	86.7%	87.3%	87.3%	86.8%	87.2%	92.5%	92.5%	93.7%		98.6%
HCU57033	87.2%	87.7%	86.8%	84.8%	83.3%	83.8%	83.6%	84.2%	83.3%	84.5%	84.0%	85.6%	87.2%	86.5%	88.0%	88.1%	87.2%	87.0%	93.4%	93.4%	93.6%	98.6%	

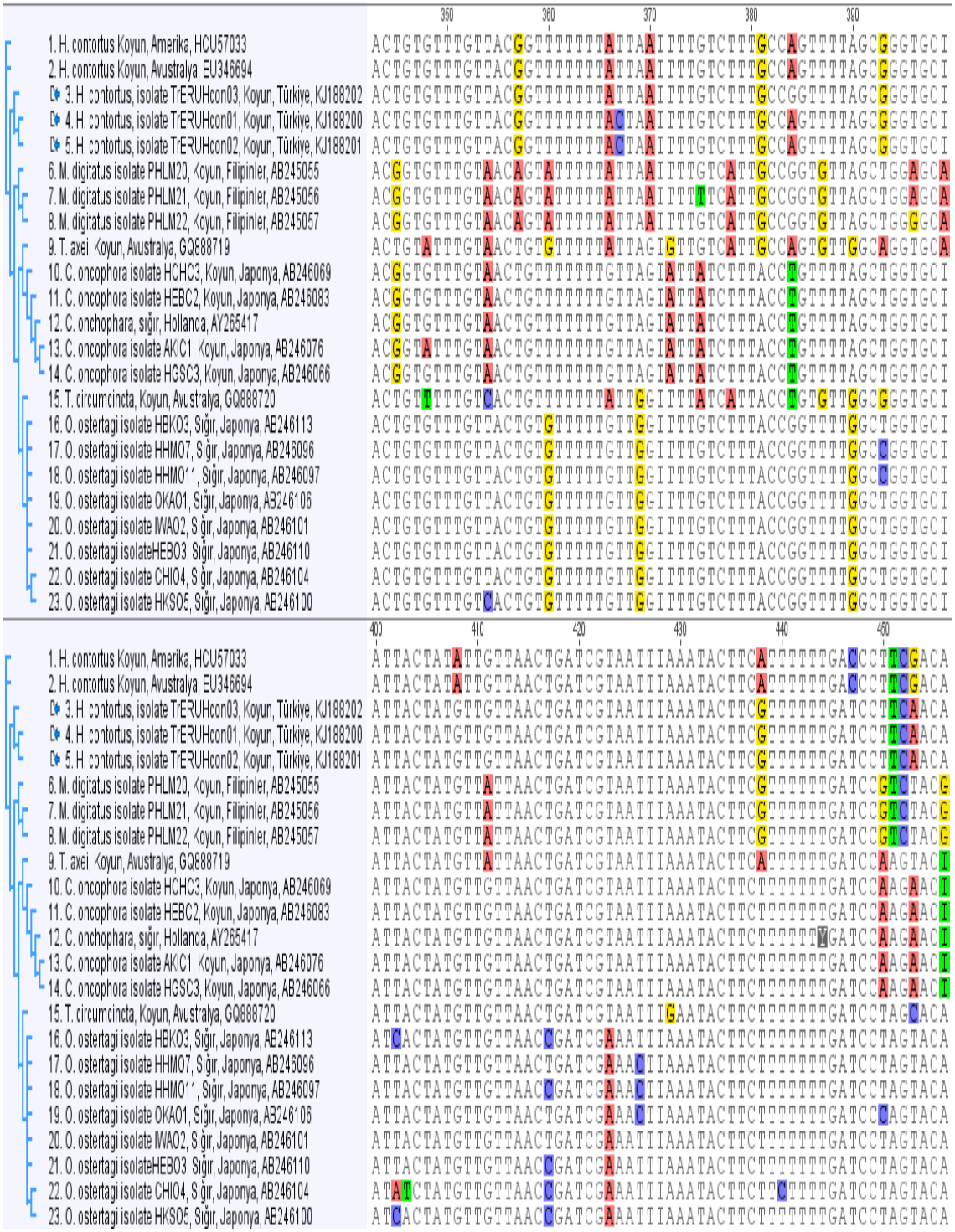
Tablo 4.16. GenBank'a kayıtları yapılan Kayseri *H. contortus* izolatlarının ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların mt-COI gen dizilimlerinin pairwise analizleri

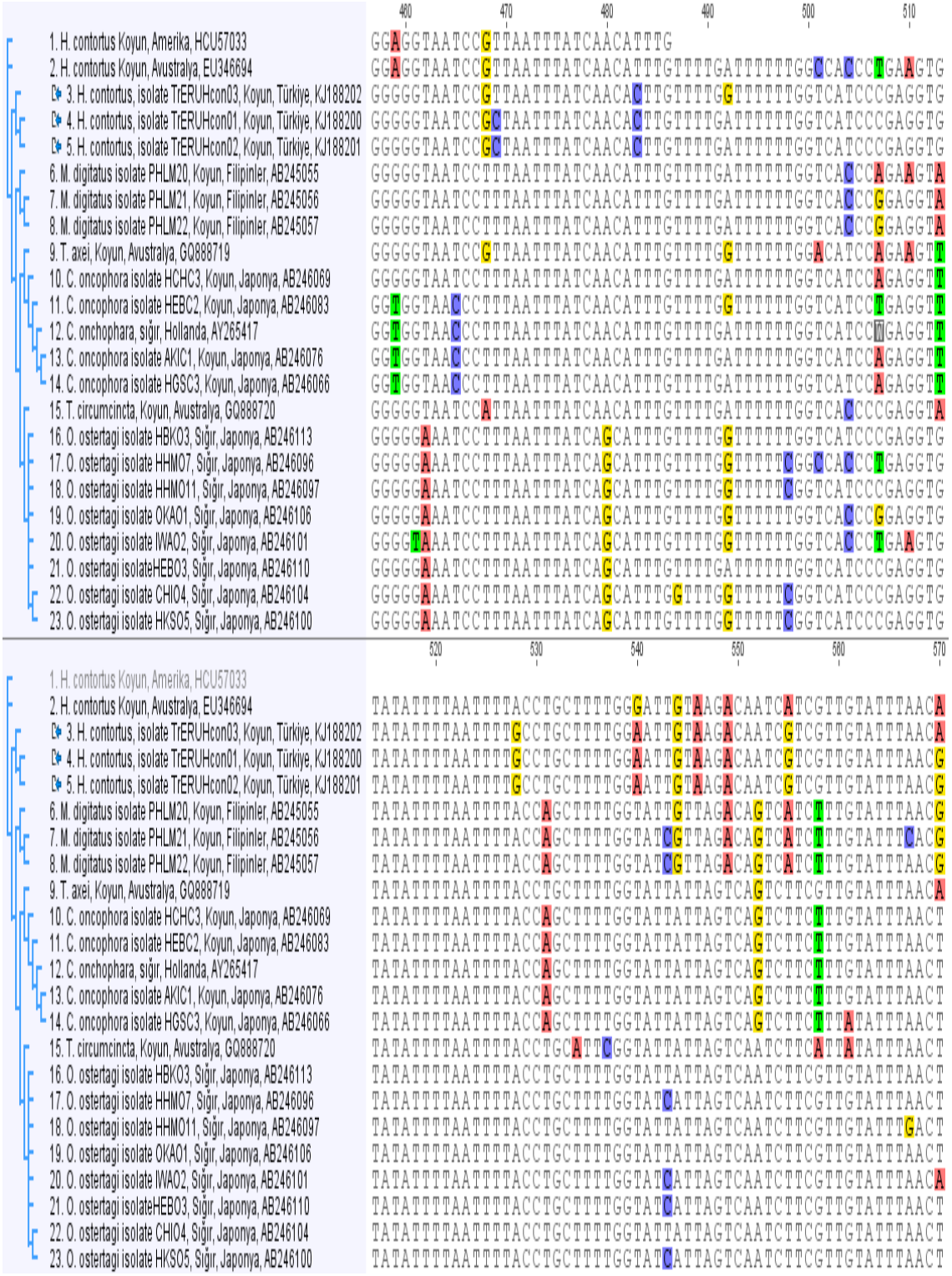
Kayseri yöresinden elde edilen *H. contortus* izolatları ile Dünya'da GenBank'a kayıtlı benzer diğer nematodlara ait izolatların, parsiyel mt-COI gen bölgelerinin multible alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.41'de gösterilmiştir.

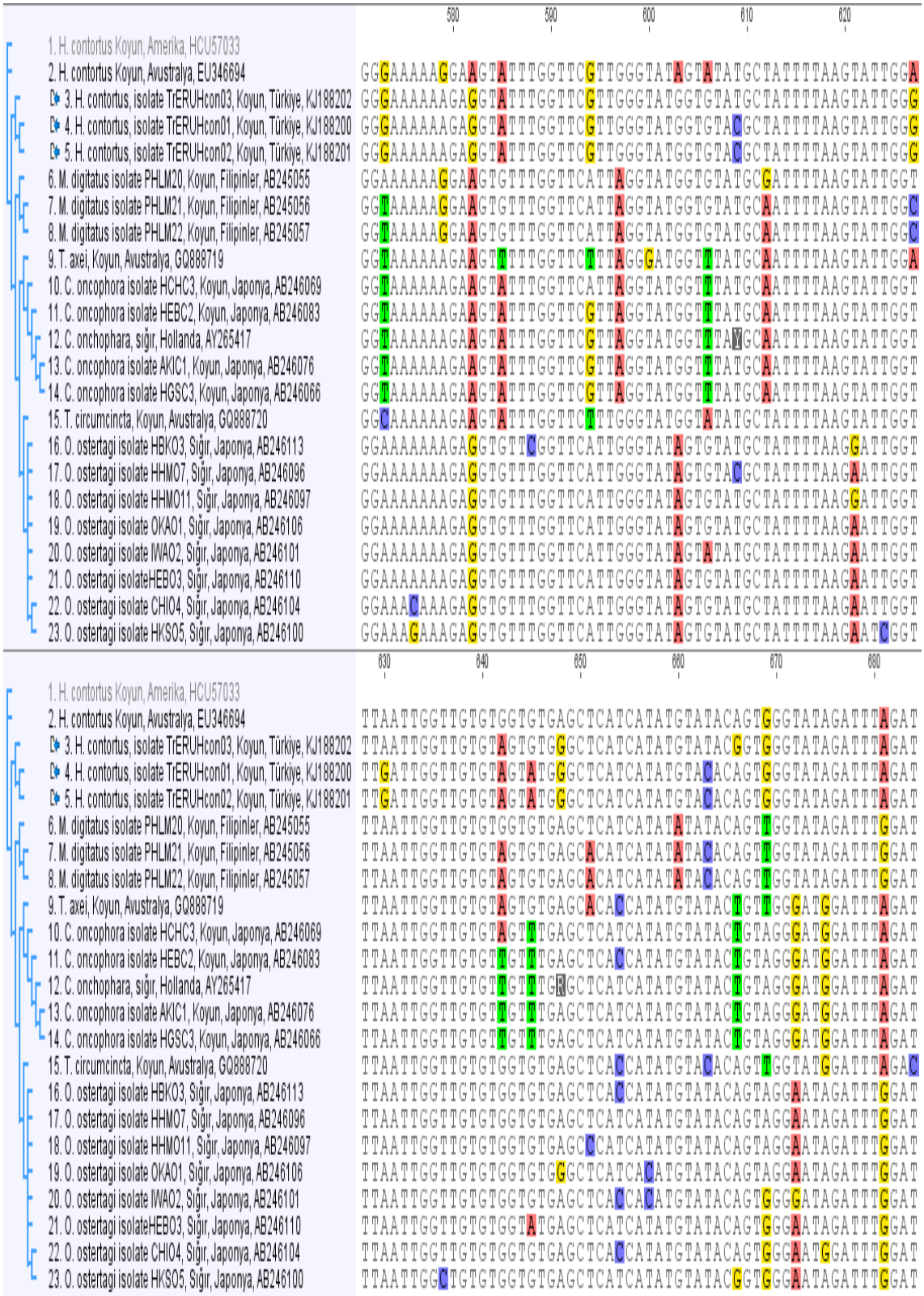


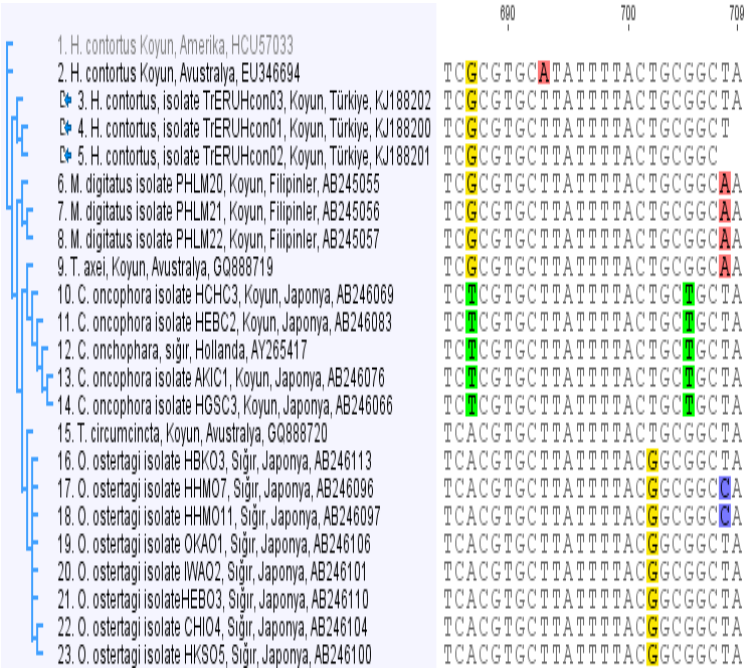

120 130 140 150 160 170
1. H. contortus Koyun, Amerika, HCU57033
2. H. contortus Koyun, Avustralya, EU346694
3. H. contortus, isolate TrERUHcon03, Koyun, Türkiye, KJ188202
4. H. contortus, isolate TrERUHcon01, Koyun, Türkiye, KJ188200
5. H. contortus, isolate TrERUHcon02, Koyun, Türkiye, KJ188201
6. M. digitatus isolate PHLM20, Koyun, Filipinler, AB245055
7. M. digitatus isolate PHLM21, Koyun, Filipinler, AB245056
8. M. digitatus isolate PHLM22, Koyun, Filipinler, AB245057
9. T. axei, Koyun, Avustralya, GQ888719
10. C. oncophora isolate HCHC3, Koyun, Japonya, AB246069
11. C. oncophora isolate HEBC2, Koyun, Japonya, AB246083
12. C. onchophara, sığır, Hollanda, AY265417
13. C. oncophora isolate AKIC1, Koyun, Japonya, AB246076
14. C. oncophora isolate HGSC3, Koyun, Japonya, AB246066
15. T. circumcincta, Koyun, Avustralya, GQ888720
16. O. ostertagi isolate HBKO3, Sığır, Japonya, AB246113
17. O. ostertagi isolate HHMO7, Sığır, Japonya, AB246096
18. O. ostertagi isolate HHMO11, Sığır, Japonya, AB246097
19. O. ostertagi isolate OKAO1, Sığır, Japonya, AB246106
20. O. ostertagi isolate IWAO2, Sığır, Japonya, AB246101
21. O. ostertagi isolateHEBO3, Sığır, Japonya, AB246110
22. O. ostertagi isolate CHIO4, Sığır, Japonya, AB246104
23. O. ostertagi isolate HKSO5, Sığır, Japonya, AB246100
180 190 200 210 220
1. H. contortus Koyun, Amerika, HCU57033
2. H. contortus Koyun, Avustralya, EU346694
3. H. contortus, isolate TrERUHcon03, Koyun, Türkiye, KJ188202
4. H. contortus, isolate TrERUHcon01, Koyun, Türkiye, KJ188200
5. H. contortus, isolate TrERUHcon02, Koyun, Türkiye, KJ188201
6. M. digitatus isolate PHLM20, Koyun, Filipinler, AB245055
7. M. digitatus isolate PHLM21, Koyun, Filipinler, AB245056
8. M. digitatus isolate PHLM22, Koyun, Filipinler, AB245057
9. T. axei, Koyun, Avustralya, GQ888719
10. C. oncophora isolate HCHC3, Koyun, Japonya, AB246069
11. C. oncophora isolate HEBC2, Koyun, Japonya, AB246083
12. C. onchophara, sığır, Hollanda, AY265417
13. C. oncophora isolate AKIC1, Koyun, Japonya, AB246076
14. C. oncophora isolate HGSC3, Koyun, Japonya, AB246066
15. T. circumcincta, Koyun, Avustralya, GQ888720
16. O. ostertagi isolate HBKO3, Sığır, Japonya, AB246113
17. O. ostertagi isolate HHMO7, Sığır, Japonya, AB246096
18. O. ostertagi isolate HHMO11, Sığır, Japonya, AB246097
19. O. ostertagi isolate OKAO1, Sığır, Japonya, AB246106
20. O. ostertagi isolate IWAO2, Sığır, Japonya, AB246101
21. O. ostertagi isolateHEBO3, Sığır, Japonya, AB246110
22. O. ostertagi isolate CHIO4, Sığır, Japonya, AB246104
23. O. ostertagi isolate HKSO5, Sığır, Japonya, AB246100


230 240 250 260 270 280
1. H. contortus Koyun, Amerika, HCU57033
2. H. contortus Koyun, Avustralya, EU346694
3. H. contortus, isolate TrERUHcon03, Koyun, Türkiye, KJ188202
4. H. contortus, isolate TrERUHcon01, Koyun, Türkiye, KJ188200
5. H. contortus, isolate TrERUHcon02, Koyun, Türkiye, KJ188201
6. M. digitatus isolate PHLM20, Koyun, Filipinler, AB245055
7. M. digitatus isolate PHLM21, Koyun, Filipinler, AB245056
8. M. digitatus isolate PHLM22, Koyun, Filipinler, AB245057
9. T. axei, Koyun, Avustralya, GQ888719
10. C. oncophora isolate HCHC3, Koyun, Japonya, AB246069
11. C. oncophora isolate HEBC2, Koyun, Japonya, AB246083
12. C. onchophara, sığır, Hollanda, AY265417
13. C. oncophora isolate AKIC1, Koyun, Japonya, AB246076
14. C. oncophora isolate HGSC3, Koyun, Japonya, AB246066
15. T. circumcincta, Koyun, Avustralya, GQ888720
16. O. ostertagi isolate HBKO3, Sığır, Japonya, AB246113
17. O. ostertagi isolate HHMO7, Sığır, Japonya, AB246096
18. O. ostertagi isolate HHMO11, Sığır, Japonya, AB246097
19. O. ostertagi isolate OKAO1, Sığır, Japonya, AB246106
20. O. ostertagi isolate IWAO2, Sığır, Japonya, AB246101
21. O. ostertagi isolateHEBO3, Sığır, Japonya, AB246110
22. O. ostertagi isolate CHIO4, Sığır, Japonya, AB246104
23. O. ostertagi isolate HKSO5, Sığır, Japonya, AB246100
290 300 310 320 330 340
1. H. contortus Koyun, Amerika, HCU57033
2. H. contortus Koyun, Avustralya, EU346694
3. H. contortus, isolate TrERUHcon03, Koyun, Türkiye, KJ188202
4. H. contortus, isolate TrERUHcon01, Koyun, Türkiye, KJ188200
5. H. contortus, isolate TrERUHcon02, Koyun, Türkiye, KJ188201
6. M. digitatus isolate PHLM20, Koyun, Filipinler, AB245055
7. M. digitatus isolate PHLM21, Koyun, Filipinler, AB245056
8. M. digitatus isolate PHLM22, Koyun, Filipinler, AB245057
9. T. axei, Koyun, Avustralya, GQ888719
10. C. oncophora isolate HCHC3, Koyun, Japonya, AB246069
11. C. oncophora isolate HEBC2, Koyun, Japonya, AB246083
12. C. onchophara, sığır, Hollanda, AY265417
13. C. oncophora isolate AKIC1, Koyun, Japonya, AB246076
14. C. oncophora isolate HGSC3, Koyun, Japonya, AB246066
15. T. circumcincta, Koyun, Avustralya, GQ888720
16. O. ostertagi isolate HBKO3, Sığır, Japonya, AB246113
17. O. ostertagi isolate HHMO7, Sığır, Japonya, AB246096
18. O. ostertagi isolate HHMO11, Sığır, Japonya, AB246097
19. O. ostertagi isolate OKAO1, Sığır, Japonya, AB246106
20. O. ostertagi isolate IWAO2, Sığır, Japonya, AB246101
21. O. ostertagi isolateHEBO3, Sığır, Japonya, AB246110
22. O. ostertagi isolate CHIO4, Sığır, Japonya, AB246104
23. O. ostertagi isolate HKSO5, Sığır, Japonya, AB246100


350 360 370 380 390
1. H. contortus Koyun, Amerika, HCU57033
2. H. contortus Koyun, Avustralya, EU346694
3. H. contortus, isolate TrERUHcon03, Koyun, Türkiye, KJ188202
4. H. contortus, isolate TrERUHcon01, Koyun, Türkiye, KJ188200
5. H. contortus, isolate TrERUHcon02, Koyun, Türkiye, KJ188201
6. M. digitatus isolate PHLM20, Koyun, Filipinler, AB245055
7. M. digitatus isolate PHLM21, Koyun, Filipinler, AB245056
8. M. digitatus isolate PHLM22, Koyun, Filipinler, AB245057
9. T. axei, Koyun, Avustralya, GQ888719
10. C. oncophora isolate HCHC3, Koyun, Japonya, AB246069
11. C. oncophora isolate HEBC2, Koyun, Japonya, AB246083
12. C. onchophara, sığır, Hollanda, AY265417
13. C. oncophora isolate AKIC1, Koyun, Japonya, AB246076
14. C. oncophora isolate HGSC3, Koyun, Japonya, AB246066
15. T. circumcincta, Koyun, Avustralya, GQ888720
16. O. ostertagi isolate HBKO3, Sığır, Japonya, AB246113
17. O. ostertagi isolate HHMO7, Sığır, Japonya, AB246096
18. O. ostertagi isolate HHMO11, Sığır, Japonya, AB246097
19. O. ostertagi isolate OKAO1, Sığır, Japonya, AB246106
20. O. ostertagi isolate IWAO2, Sığır, Japonya, AB246101
21. O. ostertagi isolateHEBO3, Sığır, Japonya, AB246110
22. O. ostertagi isolate CHIO4, Sığır, Japonya, AB246104
23. O. ostertagi isolate HKSO5, Sığır, Japonya, AB246100
400 410 420 430 440 450

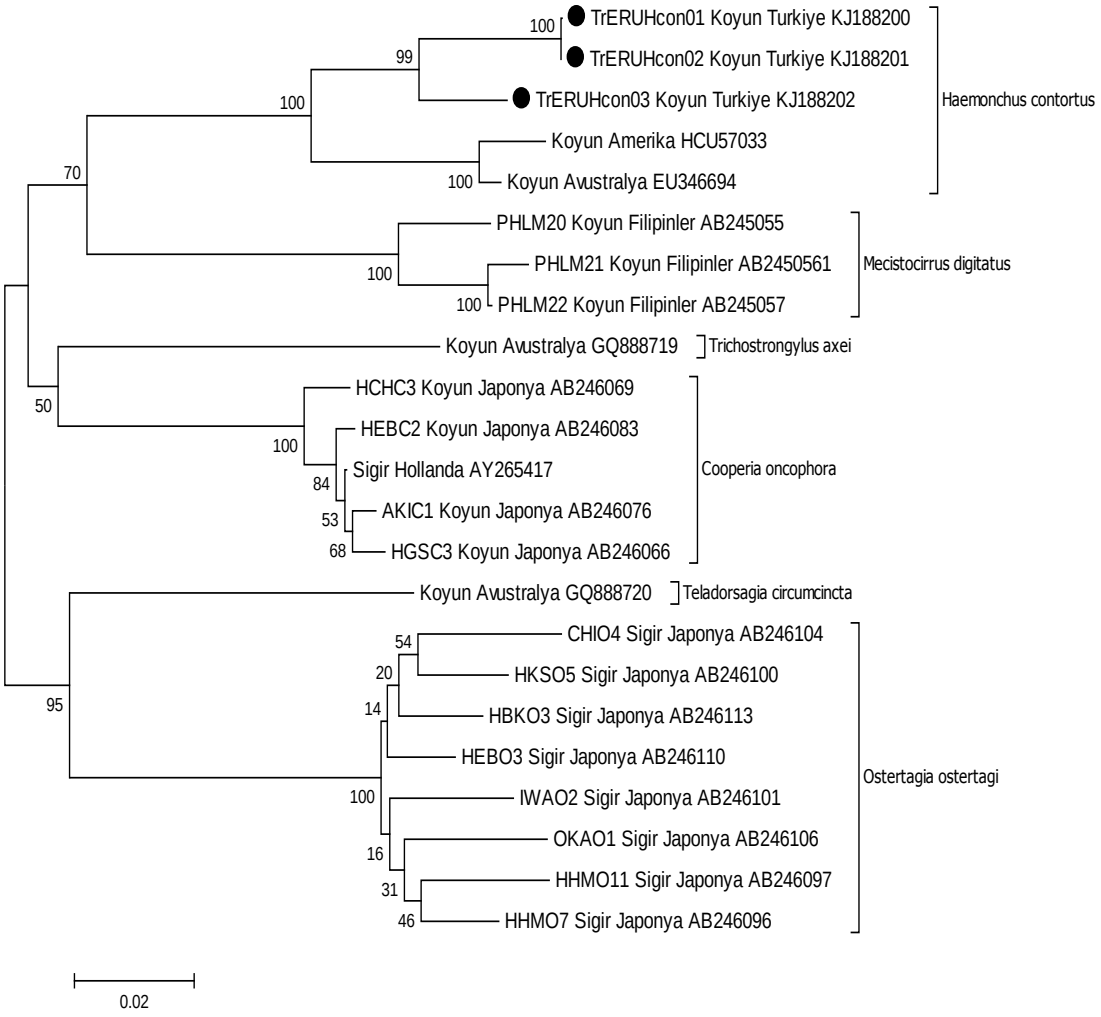

480 470 480 490 500 510
1. H. contortus Koyun, Amerika, HCU57033
2. H. contortus Koyun, Avustralya, EU346694
3. H. contortus, isolate TrERUHcon03, Koyun, Türkiye, KJ188202
4. H. contortus, isolate TrERUHcon01, Koyun, Türkiye, KJ188200
5. H. contortus, isolate TrERUHcon02, Koyun, Türkiye, KJ188201
6. M. digitatus isolate PHLM20, Koyun, Filipinler, AB245055
7. M. digitatus isolate PHLM21, Koyun, Filipinler, AB245056
8. M. digitatus isolate PHLM22, Koyun, Filipinler, AB245057
9. T. axei, Koyun, Avustralya, GQ888719
10. C. oncophora isolate HCHC3, Koyun, Japonya, AB246069
11. C. oncophora isolate HEBC2, Koyun, Japonya, AB246083
12. C. onchophara, sığır, Hollanda, AY265417
13. C. oncophora isolate AKIC1, Koyun, Japonya, AB246076
14. C. oncophora isolate HGSC3, Koyun, Japonya, AB246066
15. T. circumcincta, Koyun, Avustralya, GQ888720
16. O. ostertagi isolate HBKO3, Sığır, Japonya, AB246113
17. O. ostertagi isolate HHMO7, Sığır, Japonya, AB246096
18. O. ostertagi isolate HHMO11, Sığır, Japonya, AB246097
19. O. ostertagi isolate OKAO1, Sığır, Japonya, AB246106
20. O. ostertagi isolate IWAO2, Sığır, Japonya, AB246101
21. O. ostertagi isolateHEBO3, Sığır, Japonya, AB246110
22. O. ostertagi isolate CHIO4, Sığır, Japonya, AB246104
23. O. ostertagi isolate HKSO5, Sığır, Japonya, AB246100
520 530 540 550 560 570
1. H. contortus Koyun, Amerika, HCU57033
2. H. contortus Koyun, Avustralya, EU346694
3. H. contortus, isolate TrERUHcon03, Koyun, Türkiye, KJ188202
4. H. contortus, isolate TrERUHcon01, Koyun, Türkiye, KJ188200
5. H. contortus, isolate TrERUHcon02, Koyun, Türkiye, KJ188201
6. M. digitatus isolate PHLM20, Koyun, Filipinler, AB245055
7. M. digitatus isolate PHLM21, Koyun, Filipinler, AB245056
8. M. digitatus isolate PHLM22, Koyun, Filipinler, AB245057
9. T. axei, Koyun, Avustralya, GQ888719
10. C. oncophora isolate HCHC3, Koyun, Japonya, AB246069
11. C. oncophora isolate HEBC2, Koyun, Japonya, AB246083
12. C. onchophara, sığır, Hollanda, AY265417
13. C. oncophora isolate AKIC1, Koyun, Japonya, AB246076
14. C. oncophora isolate HGSC3, Koyun, Japonya, AB246066
15. T. circumcincta, Koyun, Avustralya, GQ888720
16. O. ostertagi isolate HBKO3, Sığır, Japonya, AB246113
17. O. ostertagi isolate HHMO7, Sığır, Japonya, AB246096
18. O. ostertagi isolate HHMO11, Sığır, Japonya, AB246097
19. O. ostertagi isolate OKAO1, Sığır, Japonya, AB246106
20. O. ostertagi isolate IWAO2, Sığır, Japonya, AB246101
21. O. ostertagi isolateHEBO3, Sığır, Japonya, AB246110
22. O. ostertagi isolate CHIO4, Sığır, Japonya, AB246104
23. O. ostertagi isolate HKSO5, Sığır, Japonya, AB246100


580
590
600
610
620
1. H. contortus Koyun, Amerika, HCU57033
2. H. contortus Koyun, Avustralya, EU346694
3. H. contortus, isolate TrERUHcon03, Koyun, Türkiye, KJ188202
4. H. contortus, isolate TrERUHcon01, Koyun, Türkiye, KJ188200
5. H. contortus, isolate TrERUHcon02, Koyun, Türkiye, KJ188201
6. M. digitatus isolate PHLM20, Koyun, Filipinler, AB245055
7. M. digitatus isolate PHLM21, Koyun, Filipinler, AB245056
8. M. digitatus isolate PHLM22, Koyun, Filipinler, AB245057
9. T. axei, Koyun, Avustralya, GQ888719
10. C. oncophora isolate HCHC3, Koyun, Japonya, AB246069
11. C. oncophora isolate HEBC2, Koyun, Japonya, AB246083
12. C. onchophara, sığır, Hollanda, AY265417
13. C. oncophora isolate AKIC1, Koyun, Japonya, AB246076
14. C. oncophora isolate HGSC3, Koyun, Japonya, AB246066
15. T. circumcincta, Koyun, Avustralya, GQ888720
16. O. ostertagi isolate HBKO3, Sığır, Japonya, AB246113
17. O. ostertagi isolate HHMO7, Sığır, Japonya, AB246096
18. O. ostertagi isolate HHMO11, Sığır, Japonya, AB246097
19. O. ostertagi isolate OKAO1, Sığır, Japonya, AB246106
20. O. ostertagi isolate IWAO2, Sığır, Japonya, AB246101
21. O. ostertagi isolateHEBO3, Sığır, Japonya, AB246110
22. O. ostertagi isolate CHIO4, Sığır, Japonya, AB246104
23. O. ostertagi isolate HKSO5, Sığır, Japonya, AB246100
630
640
650
660
670
680
1. H. contortus Koyun, Amerika, HCU57033
2. H. contortus Koyun, Avustralya, EU346694
3. H. contortus, isolate TrERUHcon03, Koyun, Türkiye, KJ188202
4. H. contortus, isolate TrERUHcon01, Koyun, Türkiye, KJ188200
5. H. contortus, isolate TrERUHcon02, Koyun, Türkiye, KJ188201
6. M. digitatus isolate PHLM20, Koyun, Filipinler, AB245055
7. M. digitatus isolate PHLM21, Koyun, Filipinler, AB245056
8. M. digitatus isolate PHLM22, Koyun, Filipinler, AB245057
9. T. axei, Koyun, Avustralya, GQ888719
10. C. oncophora isolate HCHC3, Koyun, Japonya, AB246069
11. C. oncophora isolate HEBC2, Koyun, Japonya, AB246083
12. C. onchophara, sığır, Hollanda, AY265417
13. C. oncophora isolate AKIC1, Koyun, Japonya, AB246076
14. C. oncophora isolate HGSC3, Koyun, Japonya, AB246066
15. T. circumcincta, Koyun, Avustralya, GQ888720
16. O. ostertagi isolate HBKO3, Sığır, Japonya, AB246113
17. O. ostertagi isolate HHMO7, Sığır, Japonya, AB246096
18. O. ostertagi isolate HHMO11, Sığır, Japonya, AB246097
19. O. ostertagi isolate OKAO1, Sığır, Japonya, AB246106
20. O. ostertagi isolate IWAO2, Sığır, Japonya, AB246101
21. O. ostertagi isolateHEBO3, Sığır, Japonya, AB246110
22. O. ostertagi isolate CHIO4, Sığır, Japonya, AB246104
23. O. ostertagi isolate HKSO5, Sığır, Japonya, AB246100



Şekil 4.41. Kayseri yöresinde koyunlarda belirlenen *H. contortus* izolatları ile Dünyadaki diğer bazı nematodlara ait izolatlarının parsiyel mt-COI gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları

Şekil 4.41'de görüldüğü gibi mt-COI gen bölgesine göre farklı soydaki trichostrongylid türlerine ait izolatlar arasında soy ve tür bazında intra ve interspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Bu sonuçlarla Neighbor Joining Metodu (Tamura Nei Modeli, Bootstrap 1000) ile oluşturulan filogenetik ağaçta (Şekil 4.42) görüleceği üzere *H. contortus* Kayseri izolatları *Haemonchus* soyundaki diğer izolatlarla birlikte aynı filogenetik branşta yer aldığı belirlenmiştir. TrERUHcon01, TrERUHcon02 ve TrERUHcon03 izolatlarının pairwise analizleri sonucu %96,3-%100,0 identik oldukları belirlenmiştir (Tablo 4.16). Ayrıca *H. contortus* Kayseri izolatlarının Amerika (GenBank aksesyon no: HCU57033) ve Avustralya (GenBank aksesyon no: EU346694)'da koyunlardan izole edilmiş izolatlarla ortalama %5,3±0,6 genetik farklılık gösterdiği saptanmıştır. Filogenetik ağaçta (Şekil 4.42) da görüleceği üzere *H. contortus* filogenetik grubu en yüksek yakınlığı *M. digitatus* grubu ile göstermiş (%14,2±1,4 genetik farklılık) olup bunu sırasıyla *C. onchophora* (%14,7±1,5 genetik farklılık), *T. axei* (%15,6±1,6 genetik farklılık), *T. circumcincta* (%16,2±1,6 genetik farklılık) ve *O. ostertagi* (%17,3±1,7 genetik farklılık) filogenetik grupları izlemiştir.



Şekil 4.42. Kayseri yöresinde saptanan *H. contortus* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer Trichostrongylid nematodlara ait izolatların mt-COI gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining-Tamura Nei modeli). Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir.

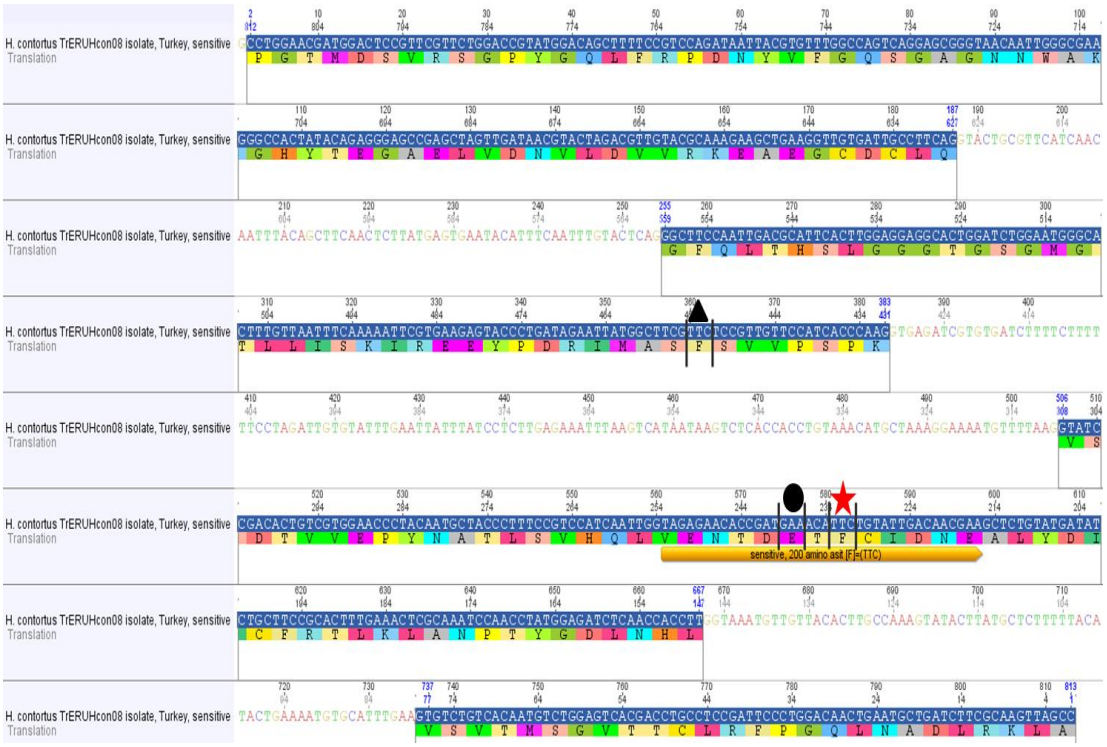
4.11. β tubulin İzotip Tip 1 Geninin Sekans ve SNPs Analizi

β tubulin İzotip Tip 1 gen bölgesi yönünden elde edilen plasmidler, vektör spesifik primer çifti ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Elde edilen nükleotid dizileri vektör sekansı ile alignment yapılarak ilgili gen bölgesinin sekansları elde edilmiştir. Sekans analizleriyle β tubulin izotip-1 gen bölgesi yönünden Real Time PCR analizlerinde allel sıklığı %100 belirlenen 9 izolatın tümü ile dirençli allel sıklığı >39 saptanan (seçilen örneklerde duyarlı allel sıklığı >55) 5 izolattan 3'ünde aminoasit dizisinde 167., 200. ve 198. kodonlarında benzimidazol duyarlı nesillerdeki sırasıyla fenilalanin (TTC), fenilalanin (TTC) ve glutamin (GAA) amino asitleri belirlenmiştir. Dirençli allel sıklığı >39 belirlenen ve sekans analizleri gerçekleştirilen 5 izolattan kalan diğer 2'sinin ise

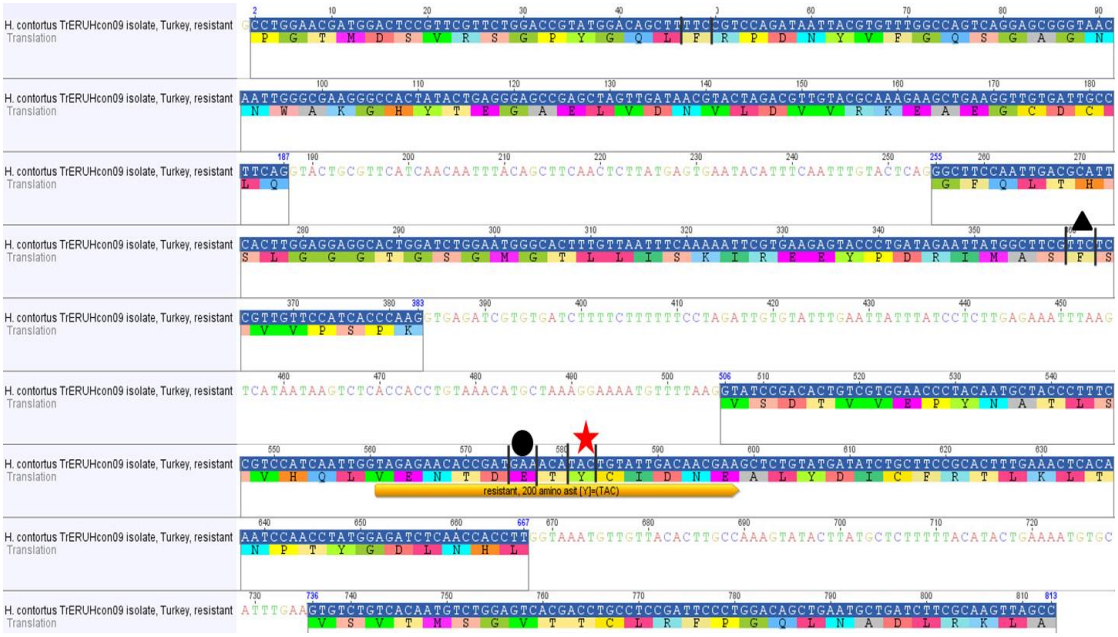
200. kodonda tek nükleotid polimorfizmi gösterdiği ve fenilalanin (TTC) amino asidinin tirozin amino asitine (TAC) dönüştüğü saptanmıştır. İlgili iki izolatın 167. ve 198. kodonlarında ise polimorfizm belirlenmemiştir. *H. contortus* β tubulin izotip-1 geni yönünden duyarlı ve dirençli belirlenen izolatlardan ikisinin GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir. Bu izolatlara ait DNA dizilerinin, konak ve izolasyon kaynakları ile moleküler olarak karakterize edilen genotipleri GenBank aksesyon numaralarıyla birlikte Tablo 4.17'de, nükleotid ve aminoasit kompozisyonları ise Şekil 4.43-4.44'de verilmiştir.

Tablo 4.17. Kayseri yöresinde koyun dışkısında belirlenen *H. contortus* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları

İzolat	Gen bölgesi	Konak	İzolasyon kaynağı	Benzimidazol Dirençliliği	Aksesyon Numarası
TrERUHcon08	β tubulin izotip-1	Koyun	Yumurta	Duyarlı	KJ410522
TrERUHcon09	β tubulin izotip-1	Koyun	Yumurta	Dirençli	KJ410523



Şekil 4.43. Benzimidazol duyarlı TrERUHcon08 izolatının β tubulin izotip-1 gen bölgesi nükleotid ve aminoasit sekansları. ▲:167. Kodon; ●: 198. kodon; ★: 200. kodon



Şekil 4.44. Benzimidazol dirençli TrERUHcon09 izolatının β tubulin izotip-1 gen bölgesi nükleotid ve aminoasit sekansları. ▲:167. Kodon; ●: 198. kodon; ★: 200. kodon

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mide-bağırsak nemotadları tüm Dünya'da başta ruminantlar olmak üzere insan dahil bir çok memelide yaygın olarak görülmekte olup oluşturdukları enfeksiyon ile özellikle sığır ve koyun yetiştiriciliğinde verim kayıplarının en önemli etkeni olarak nitelenmektedir (2, 270, 271). Trichostrongylid nematodların oluşturduğu enfeksiyonlar çoğu zaman gizli seyretmekte olup özellikle genç hayvanlarda gelişim geriliğine, yaşlı hayvanlarda ise et, süt, yapağı ve döl verimlerinde önemli ekonomik kayıplara ve hatta ölümlere neden olmaktadır (271, 272, 273). Trichostrongylid nematodlar içerisinde *Haemonchus* cinsinde yer alan türler ruminantların en önemli abomasum patojenleri olup (274) gelişimleri direkttir. Bu türler ruminantların kanla beslenen parazitlerinden biri olup koyun ve keçi sanayisinde büyük ekonomik kayıplara ve verim düşüklüğüne neden olmaktadır (169). *Haemonchus* soyu içerisinde *H. contortus* tropikal ve subtropikal bölgelerde daha yaygın görülmekte olup, oluşturdukları enfeksiyon primer olarak enfektif L3'lerin konak tarafından larva bulunan otların yenilmesi ile şekillenmektedir (11, 169). Dişi parazitlerin biyotik potansiyeli çok yüksek olup bir dişi *H. contortus* günde 10.000 yumurta çıkarabilmektedir. Ayrıca meradaki popülasyon (yumurta ve larva) düzeyi de genellikle konaktaki ergin popülasyon düzeyinden çok daha yüksektir. Bu durum, enfektif popülasyon düzeyinin geniş olmasını ve yüksek genetik variabilitenin ortaya çıkmasını sağlamaktadır (186). Özellikle çiftlik hayvanları içerisinde yoğun olarak görülen konak hareketliliği, nematod sub-popülasyonlarında

gen akışının sağlanması ve hızlanmasında esas faktör olarak bildirilmektedir (275-277). Bu açıdan yakın coğrafik alanlarda *Haemonchus* popülasyonlarının genetik yapısı düşük düzeyde genetik farklılık gösterirken (275), bu farklılığın global olarak oldukça yüksek olduğu kaydedilmektedir (278).

Hastalık etkeni patojenlerin duyarlı ve başarılı identifikasyonları bu hastalıkların erken dönemde belirlenmeleri, tedavi ve kontrol stratejilerinin belirlenmesinde kilit rol üstlenmektedir (159). Çiftlik hayvanlarında gastrointestinal nematodların teşhisinde diyare, anemi, üreme oranında azalma, canlı ağırlık kaybı, et, süt ve yün üretiminde azalma gibi klinik belirtilerden yararlanılmaktadır. Ancak klinik teşhis ile hastalık sebebi ajanların ve miks enfeksiyonların belirlenebilmesi mümkün değildir. Nitekim koyunlarda anemi, mide-bağırsak hastalık semptomları (enteritis ve bununla bağlantılı diyare), canlı ağırlık kaybı ve benzeri klinik belirtiler Trichostrongyloidea ailesindeki *Haemonchus, Teladorsagia, Ostertagia, Nematodirus, Cooperia, Trichostrongylus* ve Strongyloidea ailesindeki *Oesophagostomum* ve *Chabertia* gibi çeşitli nematodlar tarafından oluşturulan enfeksiyonlarda ortak olarak görülebilmektedir (153). Trichostrongylid nematod enfeksiyonlarının tanısı konvansiyonel olarak flotasyon (Mc Master), Baerrman tekniği veya larva kültürü gibi çeşitli tekniklerle dışkı örneklerinde nematod larva ve yumurtalarının belirlenmesi, sayımı ve identifikasyonları temeline dayanmaktadır (2, 153). Bu konvansiyonel teşhis yöntemleri zaman alıcı olmakla birlikte, teşhis hatalarına da oldukça açıktır. Ayrıca tür identifikasyonları için larval kültür zorunlu olup bu proses tanı için gerekli zamanı uzatmakta ve dolayısıyla etkili tedavi, müdahale ve kontrol süreci de gecikmektedir (159). Trichostrongylid nematod enfeksiyonlarının tanısında ayrıca antijen (coproantijen gibi) ve/veya antikor belirlemeye yönelik çeşitli immuno-serolojik teşhis yöntemleri de kullanılmıştır. Ancak özellikle konvansiyonel antikor tabanlı teknikler başta olmak üzere bu tanı testlerinin göstermiş olduğu düşük spesifite (çapraz reaksiyonlar) teşhisteki etkinliklerini sınırlamaktadır. Ayrıca serolojik testlerin, hastalığın erken veya latent dönemlerinde enfeksiyonu belirlemedeki duyarlılığı da düşük olup çoğunlukla risk faktörlerini belirleme amacıyla kullanım alanı bulmaktadırlar. Bu açıdan immuno-serolojik testler gastro-intestinal nematod enfeksiyonlarının teşhisinde sınırlı bir kullanım alanına sahip olmuştur (169, 279). Trichostrongil tip nematod enfeksiyonlarının geleneksel yöntemler ile tanısında karşılaşılan söz konusu zorluklar nedeni ile günümüzde parazitin DNA veya RNA'sını belirlemeye yönelik moleküler tanı teknikleri önem kazanmıştır. Bu

tekniklerin çeşitli patojenlerin teşhisinde kullanılmaya başlanması ile birlikte tanıdaki duyarlılık, güvenilirlik ve hız artmıştır (158,159, 280-282). Son yıllarda geniş dinamik aralığı ile DNA'nın kantitatif olarak belirlenebilmesi amacıyla hızlı, kolay ve güvenilir bir yöntem geliştirilmiştir (154). Real-time PCR tekniği, hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle günümüzde patojenlerin teşhisinde öne çıkan tekniklerin başında gelmektedir. Real Time PCR tekniği sahip olduğu yüksek duyarlılık ve özgünlük ile ruminantlarda çeşitli mide-bağırsak türlerinin spesifik ve kantitatif teşhisinde de kullanılmaya başlanmıştır (127, 159).

Türkiye'nin, gerek iklimsel gerekse ekolojik faktörler yönünden nematodların serbest yaşam safhalarının gelişmesi için çok uygun olması, hayvancılığın bilinçsiz bir şekilde yapılması, takip, kontrol ve mücadele stratejilerinin yetersiz olması mide-bağırsak nemotad enfeksiyonlarının yayılışını artırmakta ve dolayısıyla oluşturdukları verim kayıplarının da yükselmesine neden olmaktadır (63, 283). Türkiye'de günümüze kadar koyunlarda mide-bağırsak nematod enfeksiyonları üzerine çalışmalar daha çok nekropsi ve dışkı muayenesi temelinde yapılmış olup moleküler prevalans ve genotipleme çalışmaları bulunmamaktadır. Değişik coğrafik yapı ve mevsime ait farklı bölgelerde nekropsi yöntemine göre koyunlarda yapılan çalışmalarda *H. contortus* enfeksiyon oranı; Ankara'da 10 koyunda %10.99 (45), Bandırma'da 24 koyunda %10.0 (46), Trakya'da 136 koyunda %32.0 (52), Konya'da 48 koyunda %37.5 (54), Marmara bölgesinde 30 genç koyunda %37.0 ve 20 erişkin koyunda %40.0 (57), Güney Marmara bölgesinde 150 koyunda %30.0 (59), Kırıkkale'de 4 koyunda %3,6 (70), Burdur'da 50 koyunda %10.0 (61), Şanlıurfa'da 75 koyunda %9.7 (62), Van'da 104 koyunda %40.0 olarak rapor edilmiştir (41).

Dışkı muayenesi sonucunda, Kırıkkale yöresi koyunlarında en yaygın helmint türünün Trichostrongylidea sp. olduğu belirlenmiş (%38.65) bunu sırasıyla *Trichuris* sp. (%27.79), *D. dendriticum* (%19.16), *Moniezia* sp. (%10.86), *D. filaria* (%7.02), *C. ocreatus* (%6.7), *S. papillosus* (%5.43), *Fasciola* sp. (%3.51) izlemiştir (58). Afyonkarahisar ili koyunlarında en yaygın türlerin Trichostrongylidea (%75.21), *Moniezia* sp. (%12.67) ve *D. dendriticum* (%10.70) olduğu belirlenmiş, bunları sırasıyla *C. ocreatus* (%7.88), *D. filaria* (%5.91), *Trichuris* sp. (%4.50), *Protostrongylus* sp. (%3.94), *S. papillosus* (%3.38), *M. capillaris* (%1.69) ve *Neostrongylus linearis* (%1.40) izlemiştir (66). Van ve yöresi koyunlarında Trichostrongylidea sp. (%99.2),

Fasciola sp. (%60.8), *D. dendriticum* (%41.2), Metastrongylidae larvası (%58.8), *T. ovis* (%7.2), Anoplocephalidae yumurtası veya dışkıda halkası (%36.8) ve Paramphistomidae sp. (%40) oranlarında bulunmuştur (284).

Larva kültürü sonucunda, Ankara'nın Bala ilçesinin Abazlı köyünde mide bağırsak nematodları ile enfekte hayvanlardan yapılan dışkı kültüründe *Ostertagia* sp. %49.0, *Cooperia* sp. %27.0, *Trichostrongylus* sp. %14.0, *Haemonchus* sp. %9.0 ve *Nematodirus* sp.'nin %1.0 oranında olduğu belirlenmiştir (270). Bursa'da 3 farklı tarım işletmesinden alınan dışkı örneklerinin larva kültürü sonucunda 3. dönem *Nematodirus* sp., *Trichostrongylus* sp, *Haemonchus* sp. ve *Ostertagia* sp. larvaları tespit edilmiştir (59). Kırıkkale yöresi koyunlarında dominant trichostrongylidea türlerini tespit etmek için yapılan dışkı kültürlerinde *Ostertagia* sp., *Haemonchus* sp ve *Nematodirus* sp. nin yaygın olduğu bildirilmiştir (58). Afyonkarahisar ili koyunlarında dışkı kültürü sonucunda; *Trichostrongylus* %27, *Cooperia* %21, *Haemonchus* %18, *Ostertagia* %14, *Nematodirus* %12 ve *Oesophagostomum* cinsi %8 oranında kaydedilmiştir (66). Yozgat'ta enfekte dışkı örneklerinin koç katımı öncesi ve gebelik süresince aylık olarak yapılan dışkı kültürlerinde *Ostertagia, Trichostrongylus, Nematodirus, Haemonchus, Oesophagostomum/Chabertia* ve *Cooperia* soylarına ait nematodlar belirlenmiştir (63).

Bu çalışmada dışkı muayenesi sonuçlarına göre, incelemesi yapılan koyunların %73.2'si çeşitli helmint yumurtaları yönünden pozitif bulunmuştur. İdentifiye edilen yumurta tiplerine göre trichostrongylid tip etkenlerin prevalansı %48.3 ile en yaygın bulunmuş bunu, sırasıyla %36.7 ile *Marshallagia* sp., % 28.3 ile *Eimeria* sp., %14.3 ile *Nematodirus* sp., %4.3 ile *Moniezia* sp. ve %1.7 ile *T. ovis* türlerinin izlediği belirlenmiştir. Dışkı muayenesinde %48.3 görülen trichostrongylid tip etkenler Kırcalı Sevimli ve ark (66)'nın Afyonkarahisarda (%75.21) ve Değer ve Biçek (284)'in Van ve yöresinde (%99.2) yaptıkları çalışmalara göre düşük, Yıldız ve Aydenizöz (58)'in Kırıkkale'de yaptığı çalışmaya (%38.65) göre ise yüksek bulunmuştur. *Marshallagia* sp. etkenlerin prevalansı (%28.3) Güçlü ve ark (54) Konya'da yaptıkları çalışmada prevalans oranından (%68.8) daha düşük bulunmuştur. Çalışmamızda %14,3 ile *Nematodirus* sp. oranının Güçlü ve ark (54)'nın Konya'da (%25.0) ve Kalkan (47)'ın Diyarbakır yöresinde (%46.3) yapılan araştırmalarında belirlenen prevalans oranlarına göre düşük bulunmuştur. %4,3 ile *Moniezia* sp. prevalansı bazı çalışmalardaki (58,66) prevalans oranlarından daha düşük bulunmuştur. Güçlü ve ark (54)'nın Konya'da, Yıldız ve Aydenizöz (58)'nın Kırıkkalede ve Kırcalı Sevimli ve ark (66)'nın

Afyonkarahisarda yaptıkları *T. ovis* prevalansı çalışmamızda elde edilen prevalans oranından daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda bulunan *Eimeria* sp. oranı (%14.3) Gül (285)'ün Iğdır yöresinde yaptığı dışkı muayenesinde elde ettiği *Eimeria* sp. oranına göre düşük bulunmuştur. Mevcut çalışmada paraziter enfeksiyonların tek veya miks seyretmesiyle ilgili olarak en yüksek oran bir ve iki türle enfeksiyonlarda belirlenmiş bunu üç ve dört türle olan enfeksiyonlar izlemiştir. Bu sonuçların da Türkiye'de koyunlarda yapılan bazı çalışmaların (58, 66, 67) bulguları ile paralellik gösterdiği görülmüştür.

Mide bağırsak nematodları ile enfekte koyunlarda gebelik dönemi ve doğum sonrasında dışkı ile atılan yumurta sayısındaki artış (PPR), bu parazitlerin yayılışına, doğrudan veya dolaylı olarak etki etmekte ve böylece hastalığın patojenitesinin artmasına neden olmaktadır (286). Bu durumun genel olarak immunitenin hormonel baskılanması ile ortaya çıkabilmesinin yanında, yetersiz beslenme, stres ve antijenik stimülasyonun eksikliği gibi çeşitli sebeplerden dolayı da meydana gelebileceği ileri sürülmüştür. PPR'ın tropikal ve subtropikal bölgelerde görüldüğü belirtilmekle beraber, ılıman iklim kuşağında yer alan bölgelerde de buna bağlı ölümlerin ve büyük ekonomik kayıpların olduğu bildirilmiştir (35). PPR'de yumurta atılımı genellikle doğumdan 2 hafta önce başlamakta ve doğumdan sonra 8 hafta kadar devam ettiği bildirilmektedir. Böylece gebe veya laktasyondaki dişiler, yeni doğan kuzular için en büyük enfeksiyon kaynağı olmaktadırlar (38, 286).

Kenya'nın Kajiado bölgesinde yapılan bir çalışmada (287) PPR'ın doğum öncesi 2 ayda görülmeye başladığı, laktasyon periyodu boyunca artış gösterdiği ve doğum sonrası 3 ayda en üst seviyeye ulaştığı kaydedilmiştir. Chaudhry ve ark. (288), Pakistan'ın Kuzey Pencab bölgesinde gebe/laktasyondaki ve gebe olmayan dişiler üzerinde yürüttükleri çalışmalarda, çalışmanın başlangıcında gebe/laktasyondaki ve gebe olmayan dişilerin dışkıda yumurta sayısının benzer olduğunu, kuzulamadan 1 ay önce ve kuzulama sırasında gebe/laktasyondaki dişilerde dışkıda yumurta atılımında önemli ölçüde artışlar başladığını, kuzulama dönemi (Şubat) ve kuzulama sonrası (Mart-Haziran) gebe/laktasyondaki dişilerde dışkıda yumurta atılımının gebe olmayan dişilerden istatiksel anlamda ($p<0.05$) daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yaşlı hayvanlar enfeksiyonun yayılmasında ve mera kontaminasyonunda önemli rol oynamaktadır. Yaşlı hayvanlarda meraya çıkmadan önce, önceden bahar yükselmesi (spring rise) olarak da bilinen başta PPR'ın etkisiyle hipobiyotik larvalar yeniden gelişmeye başlar.

Otlatma sezonunun ilerlemesiyle birlikte hayvanlarda mide bağırsak nematodlarına karşı gelişen immunite ve meradan alınan yüksek sayıdaki larvaların antijenik etkisiyle olgun parazitlerin vücuttan atılması (self-cure) şekillenir (289, 290). Bu çalışmada enfekte koyunlarda gram dışkıdaki yumurta sayısı (EPG) ortalama 120,3±53,5 olarak belirlenmiştir. EPG düzeylerinin 2 yaş üzeri koyunlarda iki yaş altına göre yaklaşık 2 kat yüksek belirlenmesi ve bu farklılığın da istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunması, yukarıdaki çalışmaların sonuçlarına benzer olarak bu parazitlerin epidemiyolojisinde özellikle PPR'ın etkisinin bir göstergesi olarak düşünülmüştür. Buna karşın EPG düzeylerinin araştırma bölgesi ve cinsiyete göre istatistiksel açıdan bir farklılık göstermediği görülmüştür ($p>0,05$). Ancak bu noktada cinsiyet bazında çalışmada analiz edilen erkek koyun sayısının dişilere oranla oldukça düşük olması göz ardı edilmemelidir.

Moleküler tanı teknikleri ve enfeksiyöz etkenlerinin filogenetik karakterizasyonu bu etkenlerin oluşturdukları enfeksiyonlarda potansiyel genetik ve çevresel risk faktörlerinin bir arada değerlendirilmesine olanak sağlamış olup aileler içinde ve popülasyonlar arasında hastalık etkenlerinin etiyolojisi ile dağılımlarını belirlemede ve hastalıktan korunma stratejilerinin geliştirilmesinde oldukça önemli bir zemin oluşturmuştur. Ayrıca moleküler epidemiyoloji, hastalık oluşum mekanizmalarında spesifik yolların, molekül ve genlerin belirlenmesi ile hastalıkların patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Günümüze kadar trichostrongylid yumurtaların ayrımı için birçok PCR tabanlı moleküler teknik başarı ile kullanılmıştır (291-293). Real-Time PCR tekniği tek bir uygulama ile hem identifikasyon hem de kantitasyona imkân sağlamaktadır. Von Samson-Himmelstjerna ve ark. (154), ITS-2 gen bölgesinden dizayn edilen soy spesifik primer ve problarla 4 koyun trichostrongyid türüne ait 1. dönem larvaların saptanması, identifikasyonu ve kantitasyonunda Real Time PCR tekniğinin etkinliğini araştırmışlardır. Araştırıcılar (154) söz konusu tekniğin soy bazlı özgünlüğünü yüksek belirlemelerine karşın, bu tekniğin dışkıdaki yumurtalarda etkinliğinin onaylanmaması ve multiplex formatta kullanılamamasıyla her örnek için 4 ayrı teste ihtiyaç göstermesi gibi faktörlerle kullanılabilirliğinin sınırlı olduğunu belirtmişlerdir (261). At strongylidleri ve trichostrongylidlerin antihelmentik dirençli suşlarının ayrımında da diğer bazı qPCR çalışmaları (154, 223) yapılmış olup bu çalışmalar da larva ve/veya ergin DNA'sı ile sınırlı kalmıştır. Harmon ve ark. (261), son dönemde dışkıda uyguladıkları DNA ekstraksiyon tekniği ile PCR inhibitörlerinin

azaltılmasına bağlı olarak tek bir *Ostertagia ostertagi* yumurtasından geleneksel jel-tabanlı PCR sisteminde başarılı ve duyarlı olarak enzimatik amplifikasyonun gerçekleştirildiğini rapor etmişlerdir. Takip eden dönem içerisinde *H. contortus* yumurtalarının dışkı örneklerinde spesifik ve kantitatif teşhisi amacıyla ITS-2 gen bölgesinden dizayn edilen primer ve TaqMan/LNA problarla üç qPCR çalışması yapılmış ve etkinliklerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (154, 159, 261). Görüldüğü üzere Dünya'da *H. contortus*'un moleküler identifikasyonu üzerine çalışmalar sınırlıdır. Türkiye'de ise günümüze kadar geviş getiren hayvanlarda trichostrongylid nematodlar üzerine moleküler tabanlı epidemiyolojik ve filogenetik karakterizasyon çalışmaları bulunmamaktadır. Bu çalışma Türkiye'de koyunlarda *H. contortus* enfeksiyonlarının moleküler olarak araştırıldığı ilk çalışma olup söz konusu avantajları, yüksek sensitivite ve spesifitesi ile TaqMan prob bazlı Real Time PCR tekniği araştırma yöresinde koyunlardan toplanmış dışkı örneklerinde *H. contortus*'un kantitatif moleküler teşhisinde kullanılmıştır. Bu amaçla günümüze kadar mevcut iki çalışmada bildirilen (154, 261) primer ve prob setleri denenmiştir. Standardizasyon aşamalarında referans izolatlar üzerinde yapılan moleküler analizlerde von Samson-Himmelstjerna ve ark. (154)'nın *H. contortus* ribozomal ITS-2 bölgesinden dizayn ettikleri primerler ve probun non-spesifik ve çapraz pozitiflikler gösterdiği görülmüştür. Çalışmamızda Harmon ve ark. (261), tarafından dizayn edilen primerler TaqMan probunun ise *H. contortus* için yüksek duyarlılık ve özgünlükte olduğu belirlenmiş, standardizasyon basamakları sonrasında saha örneklerinin analizlerinde kullanılmıştır. Söz konusu teknikle dışkı muayenesinde trichostrongylid yumurtası saptanan 145 koyundan 36'sı *H. contortus* yönünden pozitif bulunmuş ve enfeksiyonun moleküler prevalansı %12,0 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu moleküler prevalans, Türkiye'de koyunlarda nekropsi sonuçları ile belirlenen bazı *H. contortus* prevalans çalışmaları (45, 46, 61) ile paralel bulunurken, bazılarından yüksek (70, 62) diğer bazılarından ise düşük (52, 54, 57) bulunmuştur. Bu çalışmalar arasında gözlenen prevalans farklılıkları çeşitli çalışmalarda (5, 288, 294-297) bildirildiği gibi değişik yetiştiricilik uygulamaları, doğal direnç, antiparaziter ilaç kullanımı, lokal geo-klimatik faktörler ve beslenme gibi çeşitli biotik ve/veya abiotik faktörlere bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmüştür. Benzer şekilde bu çalışmada da araştırma ilçelerine göre *H. contortus* prevalansında farklılıklar ortaya çıkmış ancak bu farklılıklar istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur. Çalışmamızda koyunların cinsiyetine göre prevalans oranları istatistiksel bir farklılık

göstermemiş olmakla birlikte erkek koyunlarda daha yüksek belirlenmiştir. Benzer sonuçlar diğer bazı araştırmalarda da (5, 86, 297-299) bildirilmiştir. Bilbo ve Nelson (300), gastrointestinal nematodlarda hayvanın cinsiyetine bağlı gözlenen bu farklılıkların immun sistem üzerine östrojenin stimülatör ve androjenlerin inhibitör etkisiyle ilişkili olabileceğini kaydetmişlerdir. Ancak çalışmamızda örneklemeye dahil edilen erkek koyun popülasyonunun sınırlı olması, cinsiyete göre belirlenen enfeksiyon oranlarının değerlendirilmesini kısıtlamaktadır. Koyunlarda yaş gruplarına göre *H. contortus* enfeksiyonlarının görülme sıklığının immun sistemin yetersizliğine bağlı olarak daha çok yavrularda ve sekonder faktörlere bağlı olarak yaşlı hayvanlarda daha yüksek olduğu kaydedilmiştir (5, 301, 302) Ancak bu çalışmada araştırmaya dahil edilen ≤2 yaş ve >2yaş grubu koyunlarda *H. contortus* enfeksiyonlarının yayılışı açısından istatistiksel bir farklılık belirlenmemiştir.

H. contortus pozitif belirlenen örneklerde saptanan Ct (dR) değerlerine göre paraziteminin >2 yaş grubunda ≤ 2 yaş grubuna oranla daha yüksek olduğu belirlenmiş ve iki grup arasındaki farklılık da istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Bu sonuç, dışkı muayenesinde trichostrongylid EPG değerlerine göre elde edilen sonuçlarla paralellik göstermiş olup aynı şekilde bu parazitlerin epidemiyolojisinde özellikle PPR'a bağlı olabileceği düşünülmüştür. Cinsiyet ve araştırma merkezi gruplarında gözlenen Ct (dR) değerlerindeki farklılık ise istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur.

Birçok enfeksiyöz etkeninin evrimsel ve filogenetik ilişkilerinin araştırılmasında çeşitli nükler ribozomal ve mitokondrial gen bölgeleri hedef olarak kullanılmıştır. Ribozomal gen bölgeleri için 18S small subunit, 5.8S ve 28S gibi large subunit, ITS-1 ve ITS-2 gibi non fonksiyonel gen bölgeleri, external transcribed spacer (ETS); mitokondriyal gen bölgeleri için ise NAD4 ve COI gibi gen bölgeleri filogenetik ilişkilerin incelenmesinde tercih edilen gen bölgeleri olmuştur (127, 153, 261). Ökaryotlarda ribozomal DNA birbirinden önceden "non transcribed spacers (NTS)" olarak bilinen intergenik spacerlar (IGS) ile ayrılmış birbirini takip eden ünitelerden oluşmuştur. Her ünite; sırasıyla 18S, 5.8S, ve 28S ribosomal RNA'yı kodlayan genler ile spacerlardan [external transcribed spacer (ETS) ve internal transcribed spacers 1 (ITS1) ve 2 (ITS2)] oluşur (303). Kodlanmayan bölgeler ITS-1 ve ITS-2, kodlanan 18S, 5.8S, ve 28S rDNA genleri arasında yer alır. ITS-1, küçük alt ünite 18S ve 5.8S alt ünitesini birbirinden ayırırken, ITS-2, büyük alt ünite 5.8S ve 28S gen bölgelerini ayırmaktadır. 18S, 5.8S ve 28S

kodlanan gen bölgeleri, popülasyon içinde yüksek düzeyde korunmuş olup üst düzey filogenilerin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun aksine kodlanmayan gen bölgeleri ITS-1 ve ITS-2 yüksek düzeyde değişkenlik gösterir ve kodlanan bölgelere göre daha hızlı oranda değişim gösterir (304, 305). Nükleer rDNA'da bulunan intergenik spacer ITS-2, Trichostrongyloidea üst ailesindeki birçok strongil nematodun moleküler filogenetik çalışmalarında moleküler araçlara büyük bir katkısı olmuştur. ITS-2 sekans kıyaslamaları birbirine çok yakın türlerin ayrımında, popülasyon farklılıklarında, tür içinde veya türler arasındaki farklılıkların ortaya konmasında ve evrimsel ilişkilerin yeniden oluşturulmasında oldukça kullanışlı olmuştur (153, 305-307). Bu çalışmada da araştırma yöresinde belirlenen *H. contortus* nesillerinin filogenetik analizlerinde söz konusu özellikleriyle ITS-2 gen bölgesi hedef gen bölgelerinden biri olarak belirlenmiş, ilgili gen bölgesinin spesifik amplifikasyonu için de GenBank kayıtlarında mevcut çeşitli *H. contortus* nesillerinin moleküler tekniklerle nükleotid dizileri analiz edilmiş ve spesifik primer dizaynı yapılmıştır. Dizayn edilen primerlerin hizalama analizleriyle spesifitesi belirlenmiş ayrıca amplifiye edilen ürünler klonlandıktan sonra sekans analizleriyle de konfirmasyonları teyit edilmiştir. Neticede dizayn edilen orijinal primer dizilerinin özellikle yöresel parazit nesilleri bazında moleküler teşhis ve filogenetik analiz çalışmalarında kullanışlı olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, Kayseri'nin farklı ilçelerindeki çiftliklerde koyun dışkılarında belirlenen *H. contortus* yumurtalarından izole edilmiş izolatların (TrERUHcon04, TrERUHcon05, TrERUHcon06, TrERUHcon07) complete ITS-2 nükleotid sekanslarının pairwise analizleri sonucu %100,0 identik oldukları görülmüştür. Ayrıca *H. contortus* Kayseri izolatlarının Dünyanın farklı bölgelerinden GenBank'a kayıtlı benzer izolatlarla ortalama %0,1 genetik farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuç çeşitli araştırıcıların (153, 305-307) da bildirdiği gibi ITS-2 gen bölgesinin diğer bir çok enfeksiyöz etkende olduğu gibi *H. contortus* izolatları arasında da yüksek homolojiye sahip olduğunu göstermiştir. Bunun yanında Kayseri *H. contortus* TrERUHcon04, TrERUHcon05, TrERUHcon06 ve TrERUHcon07 izolatları Brezilya (JN128898, JQ342247), Çin (HQ844231), İran (HQ389229), Özbekistan (KC503915), Yeni Zellanda (KC998714), Amerika (EU086383) ve Malezya'da (HQ683712) koyunlardan, İtalya (FN432336) ve Amerika'da (EU084691) keçilerden, Avustralya'da bir insan dışkısından (KC632567) izole edilmiş izolatlarla tamamen identik bulunurken Brezilya

(JN128897), Mısır (AB682686) ve Amerika'da (EU086381) koyunlardan elde edilmiş izolatlarla %0,4; Mongolya'da keçilerden izole edilmiş iki izolatla ise sırasıyla %0,5 (JN590055) ve %0,7 (JN590056) genetik farklılık göstermiştir. Neticede *H. contortus* Kayseri izolatlarının ITS-2 gen bölgesine göre identik oldukları diğer izolatlarla birlikte aynı filogenetik branşta yer aldığı ve dolayısıyla aynı genotipte oldukları ortaya konmuştur.

Mt-COI gen bölgesi, ökaryotlarda göstermiş olduğu intraspesifik polimorfizm ile nematod popülasyonlarındaki epidemiyolojik çalışmalarda, parazitlerin moleküler identifikasyonunda ve filogenetik analizlerinde yaygın olarak kullanılan mitokondrial gen bölgelerinin başında gelmektedir (308). Her bir mitokondri kendine ait bir genoma sahiptir. Mt-DNA (Mt-CO1, Mt-CO2, Mt-CO3) analizleri evrimsel çalışmalarda kullanışlı bir moleküler markerdır (309). Nematodların mt-DNA'larının evrimi diğer parazit şubeleri ile karşılaştırıldığında son derece farklı olduğu görülmekte olup genellikle AT bazları bakımından zengindir. Nitekim çalışmamızda da analiz edilen yöresel izolatların mt-COI gen bölgesinde AT oranı %65 bulunmuştur. Nematod mt-DNA'ları hızlı gelişmekte ve böylece genin yeniden düzenlenmesine ve rekombinasyonuna daha eğimli olmaktadır (307). Nematodların mitokondriyal genomları diğer metazoon gruplara göre daha küçüktür (~13.6-14.3 kb) (308). *H. contortus*'un mt-COI gen bölgesinin filogenetik analizi üzerine araştırmaların sınırlı olduğu ve GenBank veri tabanında biri mitokondrial genom olmak üzere iki kaydın (GenBank aksesyon: HCU57033, EU346694) mevcut olduğu görülmüştür. Bu kayıtlarla ilgili çalışmalardan, Jex ve ark. (231) bir ergin erkek *H. contortus*'tan izole ettikleri total genomik DNA'nın long-PCR-coupled 454 sekanslama teknolojisiyle complete mt-genomunu (GenBank aksesyon EU346694) belirlemişler ve bu mitokondrial genomun 14.055 bp uzunluğunda ve AT bakımından oldukça zengin (%78.1) olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırıcılar (231) *H. contortus* mitokondrial genomunun 36 gen içerdiğini, yapısının, büyüklüğünün ve gen düzenlemesinin Strongylidae üyeleri ile bazı farklılıklar göstermesine karşın çoğunlukla benzer özellikler gösterdiğini kaydetmişlerdir. Çalışmamızda filogenetik analizlerde hedef gen bölgelerinden biri olarak belirlediğimiz mt-COI gen bölgesinin ise ilgili çalışmada (231) toplam 1576 bp büyüklüğünde olduğu ortaya konmuştur. Diğer çalışmada ise, Sukhdeo ve ark. (310), Strongylida, Rhabditida ve Ascaridida takımında yer alan bazı nemotadların mt-COI gen bölgelerinin sekans ve filogenetik analizlerini gerçekleştirmişler ve gelişiminde

doku göçü geçiren ve geçirmeyen ilgili takımlara ait türlerin ayrı filogenetik branşta yer aldığını belirlemişlerdir. Çalışmada (310) ayrı bir filogenetik branş oluşturan Trichostrongyloidea üst ailesinde *H. contortus* (GenBank aksesyon: HCU57033), *T. axei* ve *T. circumcincta* izolatları analiz edilmiş, *H. contortus* mt-COI gen bölgesine göre *T. axei'*ye daha yakın bulunmuştur. Çalışmamızda mt-COI gen bölgesi filogenetik analizlerine göre farklı soydaki trichostrongylid türlerine ait izolatlar arasında soy ve tür bazında intra ve interspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarla *H. contortus* Kayseri izolatlarının *Haemonchus* soyundaki GenBank'ta mevcut diğer iki izolatla birlikte aynı filogenetik branşta yer aldığı belirlenmiştir. TrERUHcon01, TrERUHcon02 ve TrERUHcon03 izolatlarının %96,3-%100,0 identik oldukları ayrıca Amerika (GenBank aksesyon no: HCU57033) ve Avustralya (GenBank aksesyon no: EU346694)'da koyunlardan izole edilmiş izolatlarla da ortalama %5,3±0,6 genetik farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. Filogenetik analizler sonucunda *H. contortus* filogenetik grubu en yüksek yakınlığı Trichostrongyloidea üst ailesinde yer alan *M. digitatus* grubu ile gösterdiği, bunu ise sırasıyla *C. onchophora, T. axei, T. circumcincta* ve *O. ostertagi* filogenetik gruplarının izlediği saptanmıştır. Elde edilen bu sonucun Sukhdeo ve ark. (310)'nın bulguları ile paralellik gösterdiği görülmüştür.

Geçmişten günümüze gastrointestinal nematod enfeksiyonların kontrolünde en yaygın mücadele şekli uygun ve etkin antihelmentik kullanımı olmuştur. Bu amaçla çeşitli kimyasal gruplara dahil birçok antihelmentik etkinlik açısından araştırılmış ve kullanıma sunulmuştur. Ancak bu ilaçların sürekli ve bilinçsiz kullanımı sonucu birçok etken maddeye karşı parazitlerde direnç gelişimi ortaya çıkmış ve neticesinde günümüzde çeşitli antihelmentik gruplarının etkinliği azalmış ve zamanla ekonomik kayıpların artmasına neden olmuştur (223, 235, 311-313). Trichostrongylid nematodlarının özellikle küçük ruminantlarda tedavi ve mücadelesinde en sık kullanılan kimyasal etken maddelerinden birisi de benzimidazol grubu anthelmentiklerdir. Benzimidazoller, mikrotubul dinamiklerini inhibe ederler ve parazitik helmintlerde dirençliliğin sebebi olarak bilinen β-tubulin geninde nokta mutasyonlarına neden olurlar (196). Günümüze kadar yapılan moleküler çalışmalar β-tubulin izotip 1 genindeki 167, 198 ve 200. kodonlarda olmak üzere üç tek nükleotid polimorfizminin (SNPs) çeşitli nematod gruplarında benzimidazol dirençliliği ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (179, 314, 315). *H. contortus* için, β-tubulin isotype 1 geninin 200. kodonunda Phe/Phe (TTC/TTC) (homozygous) ve 167 ve 198. kodonlarda sırasıyla Phe/Phe [TTC/TTC] ve

Glu/Glu [GAA/GAA] (wild-type) bulunduran parazitlerin benzimidazollere duyarlı olduğu kaydedilmektedir. Bunun aksine ilgili gen bölgesinde tek nokta polimorfizmi ile 200. ve 167. kodonlarda Tyr/Tyr (TAC/TAC), 198. kodonda ise Ala/Ala (GCA/GCA) bulunduran parazit nesillerinin ise benzimidazollere dirençli olduğu ortaya konmuştur (194, 196, 315). *H. contortus* nesillerinde bu polimorfizmlerden en az birini barındıran nesiller benzimidazol dirençli olarak klasifiye edilmektedir. *H. contortus* ergin, larva ve yumurta dönemlerinde bireysel veya havuzlar oluşturularak β-tubulin izotip 1 genindeki tek nükleotid polimorfizmlerine göre çeşitli moleküler dirençlilik çalışmaları (198, 225, 315) yapılmış olup bu çalışmalar moleküler tanı tekniklerinin dirençlilik saptanmasında kullanılan konvansiyonel Dışkıda Yumurta Sayısı Azalım (FECRT) ve Larval Gelişim Testlerine (LDA) göre çok daha yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Son yıllarda *H. contortus* popülasyonlarında benzimidazol dirençliliğinin yüksek sensitivite ve spesifitede kantitatif analizine ve dolayısıyla allel sıklığının ölçümüne imkan sağlayan Real Time PCR teknolojisi ile sınırlı sayıda çalışmaların (198, 223, 267, 269) yapıldığı görülmektedir. Alvarez-Sánchez ve ark. (223), *H. contortus* popülasyonlarında larvalardan elde edilmiş genomik DNA havuzlarında, benzimidazol dirençliliğini β-tubulin izotip 1 geninde 200. kodonaki SNPs'yi hedef alarak Sybergreen tabanlı qPCR ile araştırmışlar, duyarlı popülasyonlarda duyarlı allel sıklığını %76,0, dirençli allel sıklığını %24,0 belirlerken, dirençli popülasyonlarda duyarlı allel sıklığını %28,7, dirençli allel sıklığını ise %71,3 saptamışlardır. Araştırıcılar (223), ayrıca hem duyarlı hem de dirençli popülasyonlar için real time PCR, FECRT ve LDA testlerinin sonuçları arasında iyi bir uyum olduğunu bildirmişlerdir. Walsh ve ark. (267), *H. contortus* 3. dönem larvalarında benzimidazol dirençliliğini ve dirençli allel sıklığını locked nucleic acid (LNA) Taqman probları kullanarak Real Time PCR'da araştırmışlar ve bu teknikle dirençli allel sıklığının ≥ %10 olan popülasyonlarda yüksek sensitivite ile belirlenebileceğini kaydetmişlerdir. von Samson-Himmelstjerna ve ark. (198), *H. contortus* popülasyonlarında benzimidazol dirençli allel sıklığını 3. dönem larvalarda 200. kodondaki TTC/TAC polimorfizmini hedef alarak Real Time PCR ve pyrosequencing teknolojisi ile araştırmışlar ve her iki tekniğin birbiri ile yüksek uyum gösterdiğini, konvansiyonel dirençlilik testlerinden çok daha duyarlı ve özgül olduklarını belirlemişlerdir. dos Santos ve ark. (269), Brezilya'nın kuzey doğusunda koyunlardan izole ettikleri benzimidazol duyarlı ve dirençli ergin erkek *H. contortus*'lardan oluşan toplam 7 genomik DNA havuzunda benzimidazol

dirençliliğini β-tubulin izotip 1 geninde 200. kodondaki SNPs'yi hedef alarak Sybergreen tabanlı qPCR ile araştırmışlar, duyarlı ve dirençli allel sıklığını sırasıyla %63,58-%98,24 ve % 1,76-%36,42 arasında belirlemişlerdir. Türkiye'de günümüze kadar trichostrongylid nematodlarda anthelmentik dirençliliği üzerine konvansiyonel olarak FECR testi ve larva kültürü ile yürütülmüş iki dirençlilik çalışması (64,65) yapılmıştır. Bu çalışmalardan Köse ve ark. (65), Afyonkarahisar yöresinde mide-bağırsak parazitleri ile enfekte koyunlarda albendazol, oksfendazol-oksiklozanid ve ivermektin dirençliliği üzerine yürüttükleri çalışmada larva kültürüne göre tespit ettikleri *H. contortus* ve *Oesophagostomum* spp. ile enfekte grupta ivermektin dirençliliğinin varlığını bildirirken, albendazol ve oxfendazol-oksiklozanid gruplarında dirençlilik bulunmadığını kaydetmişlerdir. Marmara bölgesinde koyunlar üzerinde yürütülen diğer çalışmada (64) ise çeşitli çiftliklerdeki koyunlardan oluşturulmuş gruplarda albendazol, tiabendazol, tetramizol ve ivermektin dirençliliği aynı tekniklerle araştırılmış, *H. contortus* ve *T. circumcincta* larvalarının identifiye edildiği yalnızca bir koyun sürüsünde tiabendazol dirençliliği olduğunu belirlemişlerdir. Mevcut çalışma Türkiye'de koyunlarda *H. contortus* popülasyonlarında benzimidazol dirençliliğinin moleküler olarak araştırıldığı ve allel frekanslarının belirlendiği ilk çalışma özelliğindedir. Çalışmamızda araştırma merkezlerindeki *H. contortus* pozitif belirlenen örneklerde benzimidazol dirençliliğinin araştırılmasında Walsh ve ark. (267) tarafından bildirilen primerler ve prob Real Time PCR'da standardizasyon aşamalarında etkin bulunmuş ve örneklerin analizinde kullanılmıştır. Real Time PCR analizleri sonucu araştırma merkezlerinde *H. contortus* pozitif belirlenen koyunlarda β tubulin izotip-1 gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmine göre benzimidazol dirençliliği açısından duyarlı allel sıklığı %87,12±16,19, dirençli allel sıklığı ise %12,88±16,19 olarak saptanmıştır. Bu sonuçların dos Santos ve ark.'nın (269), bulgularıyla paralellik gösterdiği görülmüştür. Araştırma yöresinde duyarlı allel sıklığının dirençli allel sıklığına oranla yaklaşık 7 kat yüksek olduğu belirlenmiş ($p<0,001$) olmakla birlikte benzimidazol dirençli popülasyon oranının da azımsanmayacak düzeyde olduğu dikkati çekmiştir. Benzimidazol dirençliliği allel sıklıklarının araştırma bölgesi, koyunların yaş grupları ve cinsiyete göre dağılımlarında ise istatistiksel bir farklılık ($p>0,05$) olmadığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda duyarlı ve dirençli allel sıklıklarına göre belirlenen bazı izolatlarda β tubulin izotip-1 gen bölgesinin sekansları ortaya konmuş ve benzimidazol dirençliliği

açısından SNPs araştırılmıştır. Klonlama ve plasmid pürifikasyonu sonrası duyarlı allel sıklığı %100 belirlenen örneklere ait izolatların tümü ile dirençli allel sıklığı >39 saptanan (duyarlı allel sıklığı >55) 5 izolattan 3'ünün aminoasit dizisinde şimdiye kadar trichostrongylid nematodlarda benzimidazol dirençliliği ile ilişkili bildirilen ve SNPs şekillendiği 167., 200. ve 198. kodonlarda (194, 196, 315) duyarlı nesillerdeki sırasıyla fenilalanin (TTC), fenilalanin (TTC) ve glutamin (GAA) amino asitleri olduğu görülmüş ve duyarlılık konfirmasyonu yapılmıştır. Dirençli allel sıklığı >39 olan ve sekans analizleri gerçekleştirilen 5 izolattan kalan diğer 2'sinin ise 200. kodonda tek nükleotid polimorfizmi gösterdiği ve fenilalanin (TTC) amino asidinin tirozin amino asitine (TAC) dönüştüğü saptanmıştır. Nitekim yapılan çalışmalar *H. contortus* ve diğer bazı trichostrongylid nemotadlarda benzimidazol dirençliliği ile ilgili olarak en yaygın SNPs'in 200. kodonundaki fenilalanin- tirozin polimorfizmi olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçların ilgili çalışmaların (194, 196, 315) sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüş, *H. contortus* dirençli allellere ait izolatların β tubulin izotip-1 gen bölgesinde tek nükleotid polimorfizmi yalnızca 200. kodonda belirlenmiş, 167. ve 198. kodonlarında ise polimorfizm olmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez *H. contortus* üzerine morofolojik ve moleküler analizler bir arada kullanılarak karakterizasyon ve filogeni çalışması yapılmış, moleküler epidemiyolojik veriler elde edilmiştir. Bu sonuçlarla Kayseri yöresinde *H. contortus*'un moleküler prevalansı uygulanan Real Time PCR tekniği ile kantitatif olarak ortaya konmuş olup bu tekniğin sahip olduğu yüksek duyarlılık ve özgünlükle koyunlarda *H. contortus* enfeksiyonlarında özellikle PPR'ın takibi ile tedavi ve kontrol stratejilerinin oluşturulmasında kullanılmasıyla etkin sonuçlar elde edileceği belirlenmiştir. Çalışmada Real Time PCR analizleri ile *H. contortus* pozitif belirlenen örneklere ait izolatların moleküler identifikasyon ve filogenetik çalışmalarda sıklıkla kullanılan ribozomal internal transcribed spacer 2 ve mitokondrial cytochrome oxidase subunit 1 gen bölgeleri, Türkiye'de ilk olarak genetik olarak karakterize edilmiş ve yöresel izolatların filogenetik analizleri gerçekleştirilerek GenBank kayıtları sağlanmıştır. Çalışma ile ribozomal ITS-2 gen bölgesini complete olarak amplifiye eden orijinal primer dizaynı yapılmış, GenBank veri tabanında yapılan analizlerle ve sekans analizleriyle yüksek spesifite gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda çalışma ile yine Türkiye'de bir ilk olarak *H. contortus* popülasyonlarında benzimidazol dirençliliği moleküler olarak β-tubulin izotip 1 genindeki tek nükleotid polimorfizmi'ni hedef alan

kantitatif TaqMan prob bazlı Real Time PCR yöntemi ile araştırılmış, koyunlarda duyarlı ve dirençli allel sıklıkları belirlenerek risk faktörleri ortaya konmuştur. Duyarlı ve dirençli allellere sahip izolatların klonlama ve plasmid pürifikasyonu sonrası ilgili gen bölgesi yönünden sekans analizleri gerçekleştirilerek konfirmasyonları sağlanmış, dirençli allele sahip izolatlarda SNPs belirlenmiştir. Duyarlı ve dirençli allelik yapıdaki izolatların GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar araştırma yöresinde dirençli popülasyonların varlığını ortaya koymuş olup, popülasyon dinamikleri açısından tedavi ve ilaçlama yöntemlerinin gözden geçirilmesi ve alternatif stratejilerin oluşturulmasının zorunlu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu bilimsel sonuçlar, Türkiye'de hali hazırda geviş getiren hayvanlarda trichostrongylid enfeksiyonlarına karşı başta benzimidazoller ve türevleri olmak üzere diğer bazı antihelmentiklerin gelişigüzel kullanıldığı göz önüne alındığında, dirençli parazit popülasyonlarının oluşumunun oldukça büyük bir risk oluşturduğunu da göstermektedir. Bu açıdan ülke çapında geniş kapsamlı ve özellikle yüksek duyarlılıktaki moleküler tekniklerle dirençlilik analiz çalışmalarına ihtiyaç olduğu görülmektedir. Mevcut çalışma, Türkiye'de trichostrongylid enfeksiyonlarına yol açan diğer türlerin moleküler identifikasyon ve filogenetik karakterizasyonlarının yanı sıra ilaç dirençliliğinin moleküler düzeyde belirlenmesi üzerine yapılacak gelecekteki çalışmalara da model oluşturacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Taxonomicon. Evrensel Taksonomik Hizmetleri. http:// taxonomicon. taxonomy.nl Erişim tarihi: 01.01.2014.

2. Soulsby EJL. Helminths, Artropods and Protozoa of Domesticated Animals. Seventh Edition London: Bailliere Tindal, 1982.

3. Demeler J. The Physiological Site of Action and the Site of Resistance to the Macrocyclic Lactone Anthelmintics in Sheep Parasitic Trichostrongyloid Nematodes. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2005.

4. Blaxter ML. Molecular analysis of nematode evolution. In: Kennedy MW, Harnett W (eds), Parasitic Nematodes Molecular Biology, Biochemistry and Immunology. CABI Publishing, USA, 2001, pp: 1-18.

5. Tasawar Z, Ahmad S, Lashari MH, et al. Prevalence of *Haemonchus contortus* in sheep at research centre for conservation of Sahiwal cattle (RCCSC) Jehangirabad district Khanewal, Punjab, Pakistan. Pakistan J Zool 2010; 42: 735-739.

6. Coles GC, Rhodes AC, Wolstenholme AJ. Rapid selection for ivermectin resistance in *Haemonchus contortus*. Vet Parasitol 2005; 129: 345-347.

7. Lacroux C, Nguyen THC, Andreolettı O, et al. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. Vet Res 2006; 37: 607-622.

8. Morgan BB. Veterinary Helminthology, Burgess Publishing, Minneapolis, 1949:400.

9. Kenworthy JDW. P-Glycoprotein Genes in *Haemonchus contortus*. Master thesis, Philosophy (MPhil). University of Bath, 2013.

10. Tınar R. Helmintoloji. Nobel yayın dağıtım. İstanbul, 2006; 297-302.

11. Angulo-Cubillán FJ, García-Coiradas L, Cuquerella M, de la Fuente C, Alunda JM. *Haemonchus contortus*-sheep relationship: A review, Revista Científica, Vol. XVII, Núm. 6, noviembre-diciembre, 2007, pp. 577-587.

12. Scheuerle M. Anthelmintıc resistance of *Haemonchus contortus* and the Famacha©-method as a tool to delay the development of anthelmintic resistance. VVB Laufersweıler Verlag, Giessen Printed in Germany 2009;4.

13. Terefe G, Lacroux C, Prévot F, et al. Eosinophils in *Haemonchus contortus*-infected resistant and susceptible breeds of sheep: abomasal tissue recruitment and in vitro functional state. Vet Parasitol 2009; 165:161-164.

14. Güralp N. Helmintoloji. İkinci baskı. Ankara Üniv Vet Fak Yayın No: 368, Ankara, 1981: 599.

15. Waller PJ, Rudby-Martin L, Ljungstrom BL, et al. The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. Vet Parasitol 2004; 122:207-20.

16. Dimander SO. Epidemiology and Control of Gastrointestinal Nematodes in First-season Grazing Cattle in Sweeden, Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2003.

17. Uriarte J, Llorente MM, Valderrábano J. Seasonal changes of gastrointestinal nematode burden in sheep under an intensive grazing system. Vet Parasitol 2003; 118: 79-92.

18. Shakya KP, Miller JE, Lomax LG, Burnett DD. Evaluation of immune response to artificial infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native compared with Suffolk lambs. Vet Parasitol 2011; 181: 239-247.

19. Achi YL, Zinsstag J, Yao K, et al. Host specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savannah in northern Ivory Coast. Vet Parasitol 2003; 116: 151-158.

20. Coyne MJ, Smith G, Johnstone C. A study of the mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in sheep following experimental infections. Int J Parasitol 1991a; 21: 847-853.

21. Coyne MJ, Smith G, Johnstone C. Fecundity of gastrointestinal trichostrongylid nematodes of sheep in the field. Am J Vet Res 1991b; 52: 1182-1188.

22. Tembely S, Lahlou-Kassi A, Rege JE, et al. The epidemiology of nematode infections of sheep in a cool tropical environment. Vet Parasitol 1997;70: 129-141.

23. Coyne MJ, Smith G. The development and mortality of the free-living stages of *Haemonchus contortus* in laboratory culture. Int J Parasitol 1992; 22: 641-650.

24. Krecek RC, Groeneveld HT, Maritz JI. A preliminary study of the effect of microclimate on the third-stage larvae of *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* on irrigated pasture. Int J Parasitol 1992; 22: 747-752.

25. Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. Veterinary Parasitology (2nd ed), Blackwell Science 1996: 19-164.

26. Knox MR, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience end resistance against gastrointestinal nematodes. Vet Parasitol 2006; 139: 385-393.

27. Woolaston RR, Piper LR. Selection of Merino sheep for resistance to *Haemonchus contortus*: genetic variation. Anim Sci 1996; 62: 451-460.

28. Albers GAA, Gray GD, Piper LR, et al. The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young Merino sheep. Int J Parasitol 1987; 17: 1355-1363.

29. Colditz IG, Watson DL, Gray GD, Eady SJ. Some relationships between age, immune responsiveness and resistance to parasites in ruminants. Int J Parasitol 1996; 26: 869-877.

30. Manton VJA, Peacock R, Poynter D, Silverman PH, Terry RJ. The influence of age on naturally acquired resistance to *Haemonchus contortus* in lambs. Res Vet Sci 1962; 3: 308-314.

31. Mulcahy G, O'Neill S, Donnelly S, Dalton JP. Helminths at mucosal barriers-interaction with the immune system. Adv Drug Deliv Rev 2004; 56: 853-868.

32. Watson DL, Gill HS. Effect of weaning on antibody responses and nematode parasitism in Merino lambs. Res Vet Sci 1991;51: 128-132.

33. Gauly M, Schackert M, Hoffmann B, Erhardt G. Influence of sex on the resistance of sheep lambs to an experimental *Haemonchus contortus* infection. Dtsch Tierarztl Wochenschr 2006; 113:178-181.

34. Barger IA. Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism. Int J Parasitol 1993; 23: 463-469.

35. Tembely S, Lahlou-Kassi A, Rege JE, et al. Breed and season effects on the peri-parturient rise in nematode egg output in indigenous ewes in a cool tropical environment. Vet Parasitol 1998; 77: 123-132.

36. Romjali E, Dorny P, Batubara A, et al. Peri-parturient rise in faecal strongyle egg counts of different genotypes of sheep in North Sumatra, Indonesia. Vet Parasitol 1997; 68: 191-196.

37. Woolaston RR. Selection of Merino sheep for increased and decreased resistance to *Haemonchus contortus*: periparturient effects on faecal egg count. Int J Parasitol 1992; 22: 947-953.

38. Ng'ang'a CJ, Kanyari PW, Maingi N, et al. The effect of weather on the occurrence and magnitude of periparturient rise in trichostronglyid nematode egg output in Dorper ewes in a semi-arid area of Kajiado District of Kenya. Trop Anim Health Prod 2006; 38: 389-395.

39. Agyei AD, Sapong D, Probert AJ. Periparturient rise in faecal nematode egg counts in West African dwarf sheep in southern Ghana in the absence of arrested strongyle larvae. Vet Parasitol 1991; 39: 79-88.

40. Thomas RJ, Ali DA. The effect of *Haemonchus contortus* infection on the pregnant and lactating ewe. Int J Parasitol 1983; 13: 393-398.

41. Cengiz Z, Değer MS. Van yöresinde koyunlarda Trichostrongylidosis. Türkiye Parazitol Derg 2009; 33: 222-226.

42. Umur Ş. Türkiye'de gevişenlerde görülen Trichostrongylina türleri ve tanı sorunları, 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kongre özet kitabı, s40-45,4-10 Eylül 2011,Kafkas Üniversitesi, Kars.

43. Oytun HŞ. Anadolu koyunlarının endoparaziter hastalıktan bilhassa helmint hastalıklarının önemi ve kesin teşhislerinin deneci. Yük Ziraat Enst Çalışmalar: 43, 1937.

44. Merdivenci A. Türkiye'de 1953-1958 yıllarında yaptığımız koyun ve keçi otopsileri üzerinde helmintolojik araştırmalar. Bornova Vet Bil Derg 1967;15: 143-156.

45. Güralp N. Koyunlarımızda görülen Trichostrongylidae türlerine dair sistematik araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Yayınları, Yayın No:64,1955.

46. Vural A, Doğru C, Onar E, Özkoç Ü. Bandırma veteriner zootekni araştırma koyunlarında paraziter fauna tespiti ve paraziter sağıtmanın verim üzerine etkileri. Pendik Vet Kont Araş Enst Derg 1975;52-65.

47. Kalkan A. Güney Doğu Anadoluyu temsilen Diyarbakır koyun ve kuzularında paraziter fauna tespiti çalışmaları. Etlik Vet Mikrobiol Derg 1978; 4:64-85.

48. Zeybek H. Samsun yöresi koyun ve kuzularında paraziter fauna saptama çalışmaları, AÜ Vet Fak Derg 1980; 27: 215-236.

49. Vural A, Doğru C, Onar E, Özkoç Ü. Bursa bölgesi kuzularında paraziter fauna tespiti ve parazitlerin et verimine olan etkileri. Pendik Vet Mikrobiol Derg 1980; 12: 35-51.

50. Celep A, Açıcı M, Çetindağ M, Coşkun ŞZ, Gürsoy S. Samsun yöresi sığırlarında helmintolojik araştırmalar. Etlik Vet Mikrob Derg 1990; 6: 117-130.

51. Vuruşaner C. Trakya'da kıvırcık koyunlarında abomazum ve ince bağırsak nematodları, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 1994.

52. Vuraşener C, Tüzer E. Trakya'da kıvırcık koyunlarında abomazum ve ince bağırsak nematodları. T Parasitol Derg 1996; 20: 443-455.

53. Çetindağ M, Doğanay A. Gastrointestinal helminths of buffaloes in the Samsun region. Etlik Vet Mikrob Derg 1996; 8: 46-57.

54. Güçlü F, Dik B, Kamburlugil K ve ark. Konya yöresi koyunlarında mide- bağırsak nematodlarının yayılışı ve mevsimsel dağılımı, Veterinarium 1996; 7: 51-55.

55. Çetindağ M, Bıyıkoğlu G. İç Anadolu bölgesi tiftik keçilerinde mide bağırsak nematodlarının yayılısı. Etlik Vet Mikrob Derg 1997; 9: 99-107.

56. Akkaya H. Investigations on the trichostrongylid nematodes of hair goats slaughtered in Istanbul. Acta Parasitologica Turcica 1998; 22: 77-87.

57. Öncel T. Güney Marmara bölgesindeki koyunlarda helmint türlerinin yayılışı. Türkiye Parazitol Derg 2000; 24: 414-419.

58. Yıldız K, Aydenizöz M. Kırıkkale yöresi koyunlarında helmintlerin yayılışı. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2001;48: 179-182.

59. Tınar R, Bauer C, Akyol V, Şenlik B, Çırak VY. Güney Marmara bölgesinde devlet işletmelerinde koyun Trichostrongylidae enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve antelmentiklere dirençli türlerin belirlenmesi. TÜBİTAK Proje No: VHAG-1376. 2001

60. Gökçen A, Güçlü F. Konya yöresindeki sığırlarda mide-bağırsak nematodlarının yayılışı. Türkiye Parazitol Derg 2002; 26: 426-432.

61. Umur Ş, Yukarı BA. Seasonal activity of gastro-intestinal nematodes in goats in Burdur region, Turkey. Turk J Vet Anim Sci 2005; 29: 441-448.

62. Altaş M, Sevgili M, Gökçen A ve ark. Şanlıurfa yöresindeki koyunlarda sindirim sistemi nematodlarının yaygınlığı. Türkiye Parazitol Derg 2006; 30: 317-321.

63. Yıldırım A, İça A, Düzlü Ö, Yavuz A, İnci A. Gebelik döneminde mide-bağırsak nematodları ile doğal enfekte koyunlarda parazit yükünün takibi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2007; 4: 73-77.

64. Tınar R. Akyol ÇV, Çırak VY, Şenlik B, Bauer C. Investigations on the seasonal patterns of strongyle infections in grazing lambs, and the occurrence of anthelmintic

resistance on sheep and goat farms in western Anatolia, Turkey. Parasitol Res 2005; 96: 18-23.

65. Köse M, Kozan E, Sevimli FK, Eser M. The resistance of nematode parasites in sheep against anthelmintic drugs widely used in Western Turkey. Parasitol Res 2007; 101:563-567.

66. Kırcalı Sevimli F, Kozan E, Köse M, Eser M, Çiçek H. Afyonkarahisar il merkezinde yetiştirilen sığırların mide bağırsak nematodları ve mevsimsel dağılımları. Türkiye Parazitol Derg 2007; 31: 51-56.

67. Altaş MG, Sevgili M, Gökçen A, et al. The prevalence of gastro-intestinal nematodes in hair goats of the Sanliurfa region. Turkiye Parazitol Derg 2009; 33: 20-4.

68. Girişgin AO, Selver MM, Girişgin O ve ark. Doğal ve entansif beslenen kuzuların nekropsisinde helmintolojik ve artropodolojik bulgular. Uludag Univ J Fac Vet Med 2009; 28: 15-18.

69. Bolukbas CS, Gurler AT, Beyhan YE, Acici M, Umur S. Helminths of roe deer (*Capreolus capreolus*) in the Middle Black Sea Region of Turkey. Parasitol Int 2012; 61: 729-730.

70. Gökpınar S, Yıldız K. Koyun abomasumlarında teladorsagiosis. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2013; 60: 75-78.

71. Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H, et al. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag, Stuttgart 2008.

72. Eslami AH, Nabavi L. Species of gastro-intestinal nematodes of sheep from Iran. Bull Soc Pathol 1976; 1: 92-95.

73. Herd RP, Streitel RH, Mc Clure KE, Parker CF. Control of hypobiotic and benzimidazole-resistant nematodes of sheep. J Am Vet Med Assoc 1984; 184: 726-730.

74. Fakae BB. The epidemiology of helminthosis in small ruminants under the traditional husbandry system in eastern Nigeria. Vet Res Commun 1990; 14: 381-391.

75. Fritsche T, Kaufmann J, Pfister K. Parasite spectrum and seasonal epidemiology of gastrointestinal nematodes of small ruminants in the Gambia. Vet Parasitol 1993; 49: 271-283.

76. Fakae BB, Chiejina SN. The prevalence of concurrent trypanosome and gastrointestinal nematode infections in West African dwarf sheep and goats in Nsukka area of eastern Nigeria. Vet Parasitol 1993; 49: 313-318.

77. El-Azazy OME. Seasonal changes and inhibited development of the abomasal nematodes of sheep and goats in Saudi Arabia. Vet Parasitol 1995; 58: 91-98.

78. Chaudary FR, Khan MFU, Qayyum M. 2007. Prevalence of *Haemonchus contortus* in naturally infected small ruminants grazing in the Potohar area of Pakistan. Pakistan Vet J 2007; 27: 73-79.

79. Almalaik AHA, Bashar AE, Abakar AD. Prevalence and dynamics of some gastrointestinal parasites of sheep and goats in Tulus area based on post-mortem examination. Asian J Anim Vet Adv 2008; 3: 390-399.

80. Kumsa B, Tolera A, Abebe R. Vulvar morphology and sympatry of *Haemonchus* species in naturally infected sheep and goats of Ogaden region, eastern Ethiopia. Vet Arhiv 2008; 78: 331-342.

81. Raza MA, Murtaza S, Bachaya HA, Dastager G, Hussain A. Point Prevalence of Haemonchosis in sheep and goats Slaughtered at Multan Abattoir. J Anim Plant Sci 2009; 19: 158-159.

82. Roeber F, Jex AR, Campbell AJD, et al. Evaluation and application of a molecular method to assess the composition of strongylid nematode populations in sheep with naturally acquired infections. Infect Genet Evol 2011; 11 849-854.

83. Musongong GA, Ndofor-Foleng HN, Abdurashid M. Prevalence and intensity of *Haemonchus contortus* infection in two breeds of small ruminants in Maiduguri, an arid zone of Northern Nigeria. http://en.engormix.com/MA-dairy-cattle/health/articles/haemonchus-contortus-infection-in-ruminants-t1976/165-p0.htm (03.03.2012).

84. Tefera M, Batu G, Bitew M. Prevalence of gastrointestinal parasites of sheep and goats in and around Bedelle, South-Western Ethiopia. J Vet Med 2011; 8:2.

85. Qamar MF, Maqbool A. Biochemical studies and serodiagnosis of haemonchosis in sheep and goats. J Anim Plant Sci 2012; 22: 32-38.

86. Iqbal ZM, Akhtar MN, Rıaz M. Prevalence and economic significance of Haemonchosis in sheep and goats slaughtered at Faisalabad abattoir. Pak J Agric Sci 1993; 30: 51-53.

87. Naseem AA, Rabbani MS, Afzal M. Study of gastrointestinal nematodes and taxonomy of the species of the *Haemonchus* in sheep and goats. Pak J Agric Sci 1987; 24: 279-283.

88. Pal RL, Qayyum M. Prevalence of gastrointestinal nematodes of sheep and goats in Upper Punjab, Pakistan. Pak Vet J 1993;13: 138-141.

89. Afzal M. A study of nematodes with taxonomy of the species of genus *Trichostrongylus* in sheep in district Bahawalpur. M.Sc. thesis, College of Veterinary Science, Lahore 1992.

90. Khan MQ. Prevalence of gastrointestinal parasites in sheep and goats slaughtered at Rawalpindi abattoir. J Anim Hlth Prod 1993; 12: 14-15.

91. Sajid MS, Anwar AH, Iqbal Z, Khan MN, Qudoos A. Some epidemiological aspects of gastrointestinal nematodes of sheep. Int J Agric Biol 1999; 1: 306-308.

92. Jabbar A, Campbell AJD, Charles JA, Gasser RB. First report of anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* in alpacas in Australia. Parasit Vectors 2013; 6: 243.

93. Simpson HV. Pathophysiology of parasitism abomasal: is the host or parasite responsible. Vet J 2000;177-191.

94. Rowe JB, Nolan JV, De Chaneet G, Teleni E. 1988. The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on digestion in sheep. Brit J Nut 1988; 59: 125-139.

95. Eysker M, Ploeger HW. Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. Parasitol 2000; 120: 109-119.

96. Stear M, Bairden K, McKellar QA, et al. The relationship between the number and size of nematodes in the abomasums and the concentration of pepsinogen in ovine plasma. Res Vet Sci 1999; 67: 89-92.

97. Fakae BB, Chiejina SN, Behnke JM, et al. The response of Nigerian West African Dwarf goats to experimental infections with *Haemonchus contortus*. Res Vet Sci 1999; 66: 147-158.

98. Waller PJ. International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. Int J Parasitol 1999;29: 155-164.

99. Hunter AR, Mackenzie G. The pathogenesis of a single challenge dose of *Haemonchus contortus* in lambs under six months of age. J Helminthol 1982; 56: 135-144.

100. Stear MJ, Bairden K, Duncan JL, Murray M. A comparison of the responses to repeated experimental infections with *Haemonchus contortus* among Scottish Blackface lambs. Vet Parasitol 1995; 60: 69-81.

101. Khan MQ, Hayat S, Hussain MIM, Iqbal Z. Effect of haemonchosis on body weight gain and values in sheep. Pak Vet J 1988; 8: 62-67.

102. Fetterer RH, Rhoads ML. A haemolytic factor from *Haemonchus contortus* alters erythrocyte morphology. Vet Parasitol 1998; 80: 37-45.

103. Fetterer RH, Rhoads ML. Characterization of haemolytic activity from adult *Haemonchus contortus*. Int J Parasitol 1997; 27: 1037-1040.

104. Gomez-Munoz MT, Cuquerella M, Gomez-Iglesias LA, et al. Serum antibody response of Castellana sheep to *Haemonchus contortus* infection and challenge: relationship to abomasal worm burdens. Vet Parasitol 1999;81: 281-293.

105. Yacoob A, Holmes PH, Armour J. Pathophisiology of gastrointestinal trichostrongyles in sheep: plasma losses and changes in plasma pepsinogen levels associated with parasitic challange of immune animals. Res Vet Sci 1983; 34: 305-309.

106. Vervelde L, Kooyman FNJ, Van Leeuwen MAW, et al. Age related protctive after vaccination with *Haemonchus contortus* excretory/secretory proteins. Parasitol Immunol 2001; 23: 419-426.

107. Schallig HDFH. Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. Parasitol 2000; 120: 63-72.

108. Fox MT, Jacobs DE. Blood gastrin and pepsinogen responses of native village goats in Malaysia to infection with *Haemonchus contortus*. Ann Trop Med Parasitol 1991;85: 263-267.

109. Fox MT. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. Vet Parasitol 1997;72: 285-308.

110. Umur Ş. Trichostrongil Enfeksiyonlarında İmmunite. In: Özcel MA, Turgay N, İnci A, Köroğlu E, Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. Türkiye parazitoloji derneği yayınları No: 21, İzmir, 2007: 604-638.

111. Taş Z. Van yöresinde koyunlarda, Trichostrongylidae Leiper, 1912 türlerinin teşhisi, mevsimsel aktivitesi ve yayılışı, Doktora tezi, Yüzüncü yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van 2004.

112. Alunda JM, Angulo-Cubillan F, Cuqurella M. Immunization againist ovine haemonchosis with three low molecular weight somatic antigens of adult *Haemonchus contortus*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2003; 50: 70-74.

113. Redmond DL, Knox DP. Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. Vacc 2004; 22: 4252-4261.

114. Kaur K, Kapur J, Parmar A, Sood ML. Identification of immunodominant antigens of adult *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae). J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2003; 49: 260-2.

115. Smith WD. Prospects for vaccines of helminth parasites of grazing ruminants. Int J Parasitol 1999; 29: 17-24.

116. Smith WD, Christie MG. *Haemonchus contortus*: some factors influencing the degree of resistance of sheep immunized with attenuated larvae. J Comp Pathol 1979; 89: 141-150.

117. Schallig HDFH, van Leeuwen MAW, Cornelissen A. Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory/secretory proteins in sheep. Parasit Immunol 1997; 19: 447-53.

118. Knox DP, Smith WD. Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. Vet Parasitol 2001; 100: 21-32.

119. Newton SE, Munn EA. The development of vaccines against gastro intestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. Parasitol Today 1999; 15: 116-122.

120. Newton SE, Meeusen EN. Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. Parasite Immunol 2003; 25: 283-96.

121. Munn EA, Greenwood CA, Coadwell WJ. Vaccination of young lambs by means of a protein fraction extracted from adult *Haemonchus contortus*. Parasitol 1987; 94: 385-397.

122. Kabagambe EK, Barras SR, Li Y, Pena MT, Smith WD, Miller JE. Attempts to control haemonchosis in grazing ewes by vaccination with gut membrane proteins of the parasite. Vet Parasitol 2000; 92: 15-23.

123. Olcott DD. Effect of vaccination in goat with H-GAL-GP and H-11 antigens from intestinal membrane cells of *Haemonchus contortus*. MS Thesis, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA 2006.

124. Jacobs HJ, Wiltshire C, Ashman K, Meeusen EN. Vaccination against the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, using a purified larval surface antigen. Vacc 1999; 17: 362-368.

125. Skuce PJ, Stewart EM, Smith WD, Knox DP. Cloning and characterization of glutamate dehydrogenase (GDH) from the gut of *Haemonchus contortus*. Parasitol 1999; 118:297-304.

126. Knox DP, Smith SK, Smith WD, Redmond DL, Murray JM. Thiol binding proteins. International Patent Application No: PCT/GB95/00665. 1995.

127. Bott NJ, Campbell BE, Beveridge I, et al. A combined microscopic-molecular method for the diagnosis of strongylid infections in sheep. Int J Parasitol 2009; 39: 1277-1287.

128. Özcel MA. Genel Parazitoloji. In: Özcel MA (ed), Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları. İzmir, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları 2013, No: 24, ss. 1-42.

129. Scott P. 2010. Gastrointestinal nematode Infestations in sheep.

http://www.nadis.org.uk/bulletins/gastrointestinal-nematode-infestations-in- sheep.aspx.

Erişim tarihi: 18.04.2014.

130. Noble ER, Noble GA. Parasitology: The Biology of Animals Parasites. 5th edition, Lea &Febiger, Philadelphia, 1982.

131. Mehlborn H. Encylopedia of Parasitology. Third Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2008:579-580.

132. Suchitra S, Joshi P. Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. Biochim Biophys Acta 2005;1722: 293-303.

133. Cobon DH, O'Sulluvan BM. Effect of *Haemonchus contortus* on productivity of ewes, lambs and weaners in a semi-arid environment. J Agr Sci 1992;118:245-248.

134. Aumont G, Gruner L, Hostache G. Comparison of the resistence to sympatric and allopatric isolates of *H. contortus* of Black Belly sheep in Guadalupe (FWI) and INRA 401 sheep in France. Vet Parasitol 2003;116:139-150.

135. Kaplan RM, Burke JM, Terrill TH, et al. Validation of the FAMACHA© eye color chart for detecting clinical anemia in sheep and goats on farms in the outhern United States. Vet Parasitol 2004; 123:105-120.

136. Bath GF, Van Wyk JA. Using the FAMACHA © system on commercial sheep farms in South Africa. Proceedings of the 5 th International Sheep Veterinary Congress, 22-25 January 2001, Cape Town, South Africa.

137. Dominquez-Torano IA, Fernandez-Perez FJ, Gomez-Munoz MT, Alunda JM, Cuqerella M. Humoral and cellular response in lambs vaccinated against *Haemonchus contortus* with p26/23. S Rum Res 2003;50: 29-37.

138. Perez J,Garcia PM, Hernandez S, et al. Experimental haemonchosis in goats: effects of single and multiple infections in the host response. Vet Parasitol 2003; 111: 333-342.

139. Schnieder T. Veterinäermedizinische Parasitologie. 6th edition. Parey Verlag; 2006.

140. Mes TH, Eysker M, Ploeger HW. A simple, robust and semi-automated parasite egg isolation protocol. Nat Protoc 2007; 2: 486-9.

141. Gibbs HC. Hypobiosis in parasitic nematodes-an update. Adv Parasitol 1986; 25: 129-74.

142. Sommer C. Digital image analysis and identification of eggs from bovine parasitic nematodes. J Helminthol 1996; 70: 143-51.

143. Sommer C. Quantitative characterization of texture used for identification of eggs of bovine parasitic nematodes. J Helminthol 1998; 72: 179-82.

144. Bowman DD, Lynn RC, Eberhard ML. Georgi's Parasitology for Veterinarians. 8th edition. Missouri: Elsevier Science; 2003.

145. Dobson RJ, Barnes EH, Birclijin SD, Gill JH. The survival of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in faecal culture as a source of bias in apportioning egg counts to worm species. Int J Parasitol 1992; 22: 1005-8.

146. Soulsby EJL, Stewart DF. Serological studies of the self-cure reaction insheep infected with *Haemonchus contortus*. Am J Agr Econ 1960; 11: 595-603.

147. Ndao M. Diagnosis of parasitic diseases: Old and New Approaches. Interdiscip Perspect Infect Dis 2009;1-15.

148. Lone, BA, Chishti MZ, Ahmad F, Tak H, Hassan J. Immunodiagnosis of *Haemonchus contortus* infection in sheep by indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Iran J Vet Res 2012;13: 38.

149. Tak IR, Chishti MZ, Ahmad F. Applications of studying Electrophoretic pattern of *Haemonchus contortus* as tool for vaccine designing-A Review. New York Sci J 2013; 6.

150. Prasad A, Nasir A, Singh N. Detection of anti-*Haemonchus contortus* antibodies in sheep by dot-ELISA with immunoaffinity purified fraction of ES antigen during prepatency. Indian J Exp Biol 2008; 46: 94-9.

151. Agneessens J, Claerebout E, Vercruysse J. Development of a copro-antigen capture ELISA for detecting *Ostertagia ostertagi* infections in cattle. Vet Parasitol 2001; 97: 227-38.

152. Dorny P, Claerebout E, Vercruysse J, Hilderson H, Huntley JF. The influence of a *Cooperia oncophora* priming on a concurrent challenge with *Ostertagia ostertagi* and *C. oncophora* in calves. Vet Parasitol 1997; 70: 143-51.

153. Gasser RB, Bott NJ, Chilton NB, Hunt P, Beveridge I. Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock-Bionomic and biotechnological implications. Biotechnol Adv 2008; 26: 325-334.

154. von Samson-Himmelstjerna G, Harder A, Schnieder T. Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. Int J Parasitol 2002; 32: 1529-1535.

155. Roeber F, Jex AR, Campbell AJD, et al. Evaluation and application of a molecular method to assess the composition of strongylid nematode populations in sheep with naturally acquired infections. Infect, Genet Evol 2011;11: 849-854.

156. Bişkin Z, Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö. Parazitolojide teşhis amaçlı kullanılan moleküler biyolojik teknikler. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2011; 8: 43-51.

157. Helps C, Reeves N, Tasker S, et al. Use of real-time quantitative PCR to detect *Chlamydophila felis* infection. J Clin Microbiol 2001; 39: 2675-2676.

158. Abe N. Application of the PCR-sequence-specific primers for the discrimination among larval *Anisakis* simplex complex. Parasitol Res 2008; 102: 1073-1075.

159. Learmount J, Conyers C, Hird H, et al. Development and validation of real-time PCR methods for diagnosis of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus* in sheep. Vet Parasitol 2009; 166: 268-274.

160. Dorny P, Vercruysse J. Evaluation of a micro method for the routine determination of serum pepsinogen in cattle. Res Vet Sci 1998; 65: 259-262.

161. Araz E, Tanyüksel M. Moleküler amplifikasyon teknikleri. In: Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H (Eds), Moleküler Parazitoloji. İzmir, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları 2009, No: 22, ss. 337-361.

162. Logan J, Edwards K. An overview of PCR platforms. In: Logan J, Edwards K, Saunders N (Eds), Real Time PCR: Current technology and applications. Caister Academic Pres, 2009: 8.

163. Mickael R, Fabrice G, Le Vern Y, Kerboeuf D. Modulation of multidrug resistance (MDR) system the nematode *Haemonchus contortus* by changing cholesterol content: effects on resistace to anthelmitics. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 180-187.

164. Gibson TE. Veterinary Anthelmintic Medication (3rd Ed.). Common wealth Agricultural Bureaux, Slough, Eng, 1975:108-184.

165. Miller JE, Burke JM, Terrill TH. Effect of 0.5, 1.0 and 1.5 gram copper oxide wire particles on natural infection in lambs. J Anim Sci 2005; 83 (Suppl. 2).

166. Burke JM, Miller JE. Evaluation of multiple low doses of copper oxide wire particles compared with levamisole for control of *Haemonchus contortus* in lambs. Vet Parasitol 2006; 139:145-149.

167. Fleming SA, Craig T, Kaplan RM, et al. Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. J Vet Intern Med 2006; 20:435-444.

168. Drudge JH, Szanto J, Wyatt ZN, Elam G. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of the thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. Am J Vet Res 1964; 25:1512-1518.

169. Garretson PD. Role of P-Glycoprotein in *Haemonchus contortus* Anthelmintic Resistance, Master thesis. Office of Graduate Studies of Texas A&M University, 2007.

170. Köhler P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. Int J Parasitol 2001; 31:336-45.

171. McKellar QA, Scott EW. The benzimidazole anthelmintic agents a review. J Vet Pharmacol Ther 1990; 13: 223-47.

172. Borgers M, De Nollin S. Ultrastructural changes in *Ascaris suum* intestine after mebendazole treatment in vivo. J Parasitol 1975; 61:110-22.

173. Jasmer DP, Yao C, Rehman A, Johnson S. Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. Mol Biochem Parasitol 2000; 105: 81-90.

174. Friedman PA, Platzer EG. Interaction of anthelmintic benzimidazoles and benzimidazole derivatives with bovine brain tubulin. Biochim Biophys Acta 1978; 544:605-14.

175. Köhler P, Bachmann R. Intestinal tubulin as possible target for chemotherapeutic action of mebendazole in parasitic nematodes. Mol Biochem Parasitol 1981;4: 325-36.

176. Lacey E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. Int J Parasitol 1988; 18: 885-936.

177. Sackett DL, Varma JK. Molecular mechanism of colchicine action: induced local unfolding of beta-tubulin. Biochemistry 1993; 32: 13560-5.

178. Uppuluri S, Knipling L, Sackett DL, Wolff J. Localisation of the colchicine-binding site of tubulin. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 11598-602.

179. Kwa MS, Veenstra JG, Roos MH. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype. Mol Biochem Parasitol 1994; 63: 299-303.

180. Nare B, Lubega G, Prichard RK, Georges E. 1996. p-Azidosalicyl-5- amino-6-phenoxybenzimidazole photolabels the N-terminal 63-103 amino acids of *Haemonchus contortus* b-tubulin. J Biol Chem 1996; 271:8575-81.

181. Hollomon DW, Butters JA, Barker H, Hall L. Fungal betatubulin, expressed as a fusion protein, binds benzimidazole and phenylcarbamate fungicides. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2171-3.

182. Mansour TE. Chemotherapeutic Targets in Parasites: Contemporary Strategies. Cambridge University Press, Cambridge, 2002:156-188.

183. Prichard RK. Is anthelmintic resistance a concern for heartworm control? What can we learn from the human filariasis control programs? Vet Parasitol 2005; 133: 243-253.

184. Yadav P, Singh R. A review on anthelmintic drugs and their future scope. Int J Pharm Pharm Sci 2011; 3: 1721.

185. Paiement JP, Leger C, Ribeiro P, Prichard RK. *Haemonchus contortus*: effects of glutamate, ivermectin, and moxidectin on inulin uptake activity in unselected and ivermectin-selected adults. Exp Parasitol 1999; 92: 193-8.

186. Prichard RK. Genetic variability following selction of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. Trends Parasitol 2001; 17: 445-453.

187. Prichard RK, Bachmann R, Hutchinson GW, Kohler P. The effect of praziquantel on calcium in *Hymenolepis diminuta*. Mol Biochem Parasitol 1982; 5: 297-308.

188. Pax RA, Bennett JL. Effect of colsantel on intrategumental PH in *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*. J Parasitol 1989; 75: 169-171.

189. Robert CL, Kyriazakis I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematodes parasitism in ruminants. Trends Parasitol 2001; 17: 325-330.

190. Kerboeuf D, Blackhall W, Kaminsky R, von Samson-Himmelstjerna G. P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. Int J Antimic 2003; 22: 332-46.

191. Kwa MS, Veenstra JG, Van Dijk MV, Roos MH. β-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. J Mol Biol 1995; 246:500-10.

192. Barrere V, Alvarez L, Suarez G, et al. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β-tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. Vet Parasitol 2012; 186:344-349.

193. Beech RN, Prichard RK, Scott ME. Genetic variability of the β-tubulin genes in benzimidazole-susceptible and-resistant strains of *Haemonchus contortus*. Genetics 1994; 138: 103-110.

194. Silvestre A, Cabaret J. Mutation in position 167 of isotype 1 beta tubulin gene of trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? Mol Biochem Parasitol 2002; 120:297-300.

195. Drogemuller M, Schnieder T, von Samson-Himmelstjerna G. Beta-tubulin cDNA sequence variations observed between cyathostomins from benzimidazole-susceptible and-resistant populations. J Parasitol 2004; 90: 868-870.

196. Ghisi M, Kaminsky R, Maser P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematode. Vet Parasitol 2007; 144:313-20.

197. Mottier ML, Prichard RK. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. Pharmacogenet Genomics 2008; 18:129-140.

198. von Samson-Himmelstjerna G, Walsh TK, Donnan AA, et al. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. Parasitology 2009; 136:349-58.

199. Elard L, Comes AM, Humbert JF. Sequences of beta-tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. Mol Biochem Parasitol 1996; 79: 249-53.

200. Martin RJ, Robertson AP, Bjorn H. Target sites of anthelmintics. Parasitol 1997; 114: 111-124.

201. Martin RJ, Robertson AP. Electrophysiological investigation of anthelmintic resistance. Parasitol 2000; 120: 87-94.

202. Prichard R. Anthelmintic resistance. Vet Parasitol 1994; 54:259-68.

203. Blackhall WJ, Pouliot JF, Prichard RK, Beech RN. *Haemonchus contortus*: Selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin and moxidectin-selected strains. Exp Parasitol 1998; 90:42-48.

204. Martin RJ, Murray I, Robertson AP, Bjorn H, Sangster N. Anthelmintics and ion-channels: after a puncture, use a patch. Int J Parasitol 1998; 28: 849-862.

205. Blackhall WJ, Prichard RK, Beech RN. Selection at a γ-aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/milbemycins. Mol Biochem Parasitol 2003; 131:137-145.

206. Thompson DP, Geary TG. Anthelmintic resistance. In: Lee DL (Ed), The Biology of Nematodes. Taylor & Francis, London, 2002: pp 291-320.

207. Xu M, Molento M, Blackhall W, Ribeiro P, Beech R, Prichard R. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. Mol Biochem Parasitol 1998; 91: 327-335.

208. Ford JM, Hait WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. Pharmacol Rev 1990; 42: 155-199.

209. Beugnet F, Gauthey M, Kerboeuf D. Partial in vitro reversal of benzimidazole resistance by the free-living stages of *Haemonchus contortus* with verapamil. Vet Rec 1997; 141: 575-576.

210. Molento MB, Prichard RK. Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* jirds (*Meriones unguiculatus*). Parasitol Res 1999; 85: 1007-1011.

211. Taylor MA, Hunt KR, Goodyear KL. Anthelmintic resistance detection methods. Vet Parasitol 2002a; 103:183-194.

212. Small AJ, Coles GC. Detection of anthelmintic resistance by culture in vitro of parasitic stages of ovine nematodes. Vet Parasitol 1993; 51:163-166.

213. Nipane SF., Mishra B, Panchbuddhe AN. Anthelmintic resistance-clinician's present concern. Vet World 2008;1: 281-84.

214. Coles GC, Bauer C, Borgsteede FH, et al. World Association For The Advancement Of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet Parasitol 1992; 44: 35-44.

215. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet Parasitol 2006; 36: 167-185.

216. McKenna PB. Further potential limitations of the undifferentiated faecal egg count reduction test for the detection of anthelmintic resistance in sheep. New Zeal Vet J 1997; 45: 244-246.

217. Cabaret J, Berrag B. Faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy: average versus individually based estimations. Vet Parasitol 2004; 121: 105-113.

218. Reinecke RK, Louw JP. Overberg research projects. XVI. First-stage larval reduction test versus the controlled anthelmintic test to assess the efficacy of anthelmintics against nematode parasites of sheep. J S Afr Vet Assoc 1994; 65: 108-112.

219. Lacey E, Prichard RK. Interactions of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*. Mol Biochem Parasitol 1986; 19:171-81.

220. FAO 2004. Module 2. Helminths: Anthelmintic resistance, diagnosis, management and prevention. Guidelines Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants.FAO,Roma,p.78-118.ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ag014e/ag014e02.pdf

221. Mshanga DA. Development of in vitro assays for detection of anthelmintic resistance in cattle nematodes. Master of sciencience, New Zealand, 2007.

222. Taylor MA, Hunt KR, Goodyear KL. The effects of stage- specifis selction on the development of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* in sheep. Vet Parasitol 2002b; 109:29-43.

223. Alvarej-Sanchez MA, Perez-Garcıa J, Cruz-Rojo MA, et al. Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep. Vet Parasitol 2005; 129: 291-298.

224. Gilleard JS. Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics. Int J Parasitol 2006; 36:1227-1239.

225. Höglund J, Gustafsson K, Ljungström BL, et al. Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the beta-tubulin gene. Vet Parasitol 2009; 161(1-2):60-68.

226. Otsen M, Hoekstra R, Plas ME, et al. Amplified fragment length polymorphism analysis of genetic diversity of *Haemonchus contortus* during selection for drug resistance. Int J Parasitol 2001; 31:1138-1143.

227. Otsen M, Plas ME, Lenstra JA, et al. Microsatellite diversity of isolates of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. Mol Biochem Parasitol 2000; 110: 69-77.

228. Silvestre A, Humbert JF. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. Exp Parasitol 2000; 95:271-276.

229. Tiwari J, Kumar S, Kolte AP, et al. Detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique. Vet Parasitol 2006; 138:301-307.

230. Conneely BM, McCarthy E, Good B, et al. *Haemonchus contortus* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF680983 (25.04.2012).

231. Jex AR, Hu M, Littlewood DT, et al. Using 454 technology for long-PCR based sequencing of the complete mitochondrial genome from single *Haemonchus contortus* (Nematoda). BMC Genomics 2008; 9:11.

232. Elard L, Humbert JF. Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1 beta tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. Parasitol Res 1999; 85:452-456.

233. Pape M, Posedi J, Failing K, et al. Analysis of the beta-tubulin codon 200 genotype distribution in a benzimidazole-susceptible and resistant cyathostome population. Parasitology 2003; 127: 53-59.

234. Winterrowd CA, Pomroy WE, Sangster NC, et al. Benzimidazole resistant beta tubulin alleles in a population of parasitic nematode (*Cooperia oncophora*) of cattle. Vet Parasitol 2003; 117:161-172.

235. Corley CMM, Jarmon AA. A common beta tubulin isotype-1 gene single nucleotide polymorphism as a tool for detection and quantitation of anthelmintic resistant *Haemonchus contortus* in grazing goats. The J Agr Sci 2012; 4:1-11.

236. Ahmed MAA. Gastrointestinal (nematode) infections in small ruminants: Epidemiology, anthelmintic efficacy and the effect of wattle tannins. Master thesis. Animal Science Discipline of Animal and Poultry Sciences School of Agricultural Sciences and Agribusiness University of KwaZulu-Natal Pietermaritzburg 2010.

237. Epe C, Holst C, Koopmann R, et al. Experiences with *Duddingtonia flagrans* administration to parasitized small ruminants. Vet Parasitol 2009; 159: 86-90.

238. Larsen TM. Biological control of helminthes. Int J Parasitol 1998; 29: 139-146.

239. Waller PJ, Knox MR, Faedo M. The potential of nematophagagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: feeding and block studies with *Duddingtonia Flagrans*. Vet Parasitol 2001; 102: 321-330.

240. Pinnock DE. The use of *Bacillus thuringiensis* for control of pests of livestock. Agr Ecosyst Environ 1994; 49: 59-63.

241. Bone LW, Bottjer KP, Gill SS. Alteration of *Trichostrongylus colubriformis* egg permeability by *Bacillus thuringinsis israelenisis* toxin. J Parasitol 1987; 73: 295-99.

242. Horak P, Welser J, Mikes L, Kdarova L. The effects of *Bacillus thuringiensis* M-exotoxin on trematode cercariae. J Invertebr Pathol 1996; 68: 41-49.

243. Wei JZ, Hale K, Carta L, Platzer E, Wong C, Fang SC, Aroian RV. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. Proc Natl Acad Sci 2003; 100: 2760-65.

244. Thomas GW, Cooper B, Lauckner B. Preliminary investigation into the use of neem as an anthelmintic for the control of gastro-intestinal parasites of small ruminants. Antigua, zufindenin, http://www.agriculture.gov.bb/files/Neem.pdf (24.04.2006).

245. Gillian S, Behnke JM, Buttle DJ, Duce LR. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? Trends Parasitol 2004; 20: 322-27.

246. Burke JM, Miller JE, Brauer DK. The effective-ness of copper oxide wire particles as anthelmintic in pregnant ewes and safety to offspring. Vet Parasitol 2005; 131:291-97.

247. Hagerman AE, Butler LG. Tannins and lignins. In: Rosental GA, Berenbaum MR (Eds), Their Interraction with Secondery Plant Metabolites. San Diego, Academic Press, 1991:355-76.

248. Athanasiadou SL, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. Direct anthelminthic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. Vet Parasitol 2001a; 99: 205-19.

249. Min BR, Hart SP. Tannins for suppression of internal parasites. J Anim Sci 2003; 81:102-109.

250. Haslem E. Plant polyphenols-Vegetable tannins. U.K, Cambridge Univ Press, 1989: 1-13.

251. Reed JD. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. J Anim Sci 1995; 73:1516-28.

252. Barry TN, McNabb WC. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. Br J Nutr 1999; 81: 263-72.

253. Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. Anim Feed Sci Tech 2003; 106: 3-19.

254. Athanasiadou SL, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. The effects of condensed tannins supplementation of food with different protein content on parasitism food intake and performance of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. Br J Nutr 2001b; 86: 697-706.

255. Rojas DK, López J, Tejada I, et al. Impact of condensed tannins from tropical forages on *Haemonchus contortus* burdens in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) and Pelibuey lambs. Anim Feed Sci Tech 2006; 128: 218-228.

256. Nguyen TM, Van Binh D, Ørskov ER. Effect of foliages containing condensed tannins and on gastrointestinal parasites. Anim Feed Sci Tech 2005; 121: 77-87.

257. Min BR, Hart SP, Miller D, et al. The effect of grazing forage containing condensed tannins on gastrointestinal parasite infection and milk composition in Angora does. J Vet Parasitol 2005; 130: 105-113.

258. Kahiya C, Mukaratirwa S, Thamsborg SM. Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia Karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. Vet Parasitol 2003; 115: 265-274.

259. Kassai T. Veterinary Helminthology. Butterworth-Heinemann, Linarce House, Jordon Hill, Oxford, 1999.

260. Barrère V, Keller K, von Samson-Himmelstjerna G, Prichard RK. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. Parasitol Int 2013; 62: 464-470.

261. Harmon AF, Williams ZB, Zarlenga DS, Hildreth MB. Real-time PCR for quantifying *Haemonchus contortus* eggs and potential limiting factors. Parasitol Res 2007; 101: 71-76.

262. Brasil BSAF, Nunes RL, Bastianetto E, et al. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. Int J Parasitol 2012; 42:469-479.

263. Kanzaki N, Futai K. A PCR primer set for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the xylophilus group. Nematology 2002; 4:35-41.

264. Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symposium Series 1999; 41: 95-98.

265. Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, et al (2014). Geneious v5.5, Available from http://www.geneious.com (22.04.2014).

266. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 2011; 28:2731-2739.

267. Walsh TK, Donnan AA, Jackson F, Skuce P, Wolstenholme AJ. Detection and measurement of benzimidazole resistance alleles in *Haemonchus contortus* using real-time PCR with locked nucleic acid Taqman probes. Vet Parasitol 2007;144: 304-12

268. Germer S, Holland MJ, Higuchi R. High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. Genome Res 2000; 10: 258-266.

269. dos Santos BJML, Monteirob JP, Ribeiroa WLC, et al. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. Vet Parasitol 2014;199:160-164.

270. Öge S, Ayaz E, Gıcık Y. Netobimin ve Moxidectin'in doğal enfekte koyunlarda mide bağırsak nematodlarına etkisi. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 1996; 2: 199-203.

271. Molento MB. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. Vet Parasitol 2009;163: 229-234.

272. Burgu A, Güçlü F. Evcil ruminantlarda Anoplocephalose. Etlik Vet Mikrobiyol Derg 1990; 6; 131-146.

273. Charlier J, Höglund J, Dorny P, von Samson-Himmelstjerna G, Vercruysse J. Gastrointestinal nematode infections in adult dairy cattle: impact on production, diagnosis and control. Vet Parasitol 2009; 164: 70-79.

274. O'Connor LJ, Walkden-Brown SW, Kahn LP. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. Vet Parasitol 2006; 142:1-15.

275. Blouin MS, Yowell CA, Courtney CH, Dame JB Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. Genetics 1995;141: 1007-1014.

276. Braisher TL, Gemmell NJ, Grenfell BT, Amos W. Host isolation and patterns of genetic variability in three populations of *Teladorsagia* from sheep. Int J parasitol 2004;34: 1197-1204.

277. Silvestre A, Sauve C, Cortet J, et al. Contrasting genetic structures of two parasitic nematodes, determined on the basis of neutral microsatellite markers and selected anthelmintic resistance markers. Mol Ecol 2009; 18: 5086-5100.

278. Troell K. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Haemonchus contortus* in Sweden, Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala 2006.

279. Johnson DA, Behnke JM, Coles GC. Copro-antigen capture ELISA for the detection of *Teladorsagia* (*Ostertagia*) *circumcincta* in sheep: improvement of specificity by heat treatment. Parasitology 2004;129:115-26.

280. Criado-Fornelio A, Buling A, Cunha-Filhob NA, et al. Development and evaluation of a quantitative PCR assay for detection of *Hepatozoon* sp. Vet Parasitol 2007;150:352-356.

281. Nielsen MK, Peterson DS, Monrad J, et al. Detection and semi-quantification of *Strongylus vulgaris* DNA in equine faeces by real-time quantitative PCR. Int J Parasitol 2008;38: 443-453.

282. ten Hove RJ, Verweij JJ, Vereecken K, et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008;102: 179-185.

283. Doğanay A, Öge S. Türkiye'de koyun ve keçilerde görülen helmintler. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 1997; 3: 97-114.

284. Değer S, Biçek K. Van ve yöresinde koyunlarda endoparaziter fauna tespiti ve paraziter invazyonların kontrolü üzerine öneriler. YYÜ Vet Fak Derg 2005; 16:51-54.

285. Gül A. Iğdır yöresinde koyunlarda endoparaziter fauna tespiti (Coccidiosis, Helminthiasis). YYÜ Vet Fak Derg 2007; 18: 7-11.

286. Mekonnen SM. Helminth Parasites of Sheep and Goats in Eastern Ethiopia Epidemiology, and Anthelmintic Resistance and its Management, Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala 2007.

287. Ng'ang'a CJ, Munyua WK, Maingi N, Kanyari PW. Occurrence of peri-parturient rise in trichostrongylid nematode egg output in Dorper ewes in a semi-arid area of Kajiado District of Kenya. Acta Trop 2004; 92: 213-218.

288. Chaudhry FR, Qayyum M, Khan MFU, et al. Peri-Parturient rise in faecal nematode egg counts with reference to *Haemonchus contortus* in Bulkhi ewes in Northern Punjab, Pakistan. Pakistan J Zool 2009; 41: 437-443.

289. Ranjan S, Trudeau C, Prichard RK, Pichè C, Bauck S. Epidemiological study of parasite infection in a cow-calf beef herd in Quebec. Vet Parasitol 1992; 42: 281-293.

290. Miller JE. Horohov DW. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. J Anım Sci 2006; 84: 124-132.

291. Zarlenga DS, Gasbarre LC, Boyd P, et al. Identification and semi-quantitation of *Ostertagia ostertagi* eggs by enzymatic amplification of ITS-1 sequences. Vet Parasitol 1998; 77: 245-57.

292. Schnieder T, Heise M, Epe C. Genus-specific PCR for the differentiation of eggs or larvae from gastrointestinal nematodes of ruminants. Parasitol Res 1999;85: 895-898.

293. Zarlenga DS, Chute MB, Gasbarre LC, Boyd PC. A multiplex PCR assay for differentiating economically important gastrointestinal nematodes of cattle. Vet Parasitol 2001; 97: 199-209.

294. Datta FU, Nolan JV, Row JB, Gray GD, Crook BJ. Long-term effects of short term provision of protein enriched diet on resistance to nematode infection and live weight gain and wool growth in sheep. Int J Parasitol 1999; 29: 479-488.

295. Lindqvist A, Ljungstrom BL, Nilsson O, Waller PJ. The dynamics, prevalence and impact of nematode infections in organically raised sheep in Sweden. Acta Vet Scand 2001; 42: 377-389.

296. Barnes EH, Dobson RJ, Stein PA, Lejambre LF. Selection of different genotype larva and adult worms for anthelmintic resistance by persistent and short acting avermectin/ milberrycins. Int J Parasitol 2001; 31: 720-727.

297. Mandonnet N, Ducrocq V, Arquet R, Aumont G. Mortality of Creole kids during infection with gastrointestinal strongyles: a survival analysis. J Anim Sci 2003; 81: 2401-2408.

298. Maqsood M, Iqbal Z, Chaudhry AH. Prevalence and intensity of Haemonchosis with reference to breed, sex and age of sheep and goats. Pak Vet J 1996; 16: 41-43.

299. Vanimisetti HB. Genetics of resistance to *Haemonchus contortus* infection in sheep. M. S. thesis, Virginia Polytechnic and State University, Virginia, 2003.

300. Bilbo SD, Nelson RJ. Sex steroid hormones enhance immune function in male and female Hamsters. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001; 280: 207-213.

301. Faizal AC, Rajapakse RP. Prevalence of coccidia and gastrointestinal nematode infections in cross bred goats in the dry areas of Sri Lanka. Small Rumin Res 2001; 40: 233-238.

302. Horak IG. Parasites of domestic and wild animals in South Africa. XLII. Helminths of sheep on four farms in the Eastern Cape Province. Onderstepoort J Vet Res 2003; 70: 175-86.

303. Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q Rev Biol. 1991;66: 411-53.

304. Schlötterer C, Hauser MT, von Haeseler A, Tautz D. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. Mol Biol Evol 1994; 11: 513-522.

305. Troell K. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Haemonchus contortus* in Sweden. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, 2006.

306. Troell K, Mattsson JG, Alderborn A, Höglund J. Pyrosequencing™ analysis identifies discrete populations of *Haemonchus contortus* from small ruminants. Int J Parasitol 2003; 33, 765-771.

307. Anderson TJ, Blouin MS, Beech RN. Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. Adv Parasitol 1998; 41: 219-283.

308. Hu M, Chilton NB, Gasser RB. The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio-economic importance: recent progress, and implications for population genetics and systematics. Adv Parasitol 2004; 56: 133-212.

309. Avise JC. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2004:684.

310. Sukhdeo SC, Sukhdeo MVK, Black MB, Vrijenhoek RC. The evolution of tissue migration in parasitic nematodes (Nematoda: Strongylida) inferred from a protein-coding mitochondrial gene. Biol J Linn Soc 1997; 61: 281-298.

311. Maingi N, Bjørn H, Thamsborg SM, Bøgh HO, Nansen P. A survey of anthelmintic resistance in nematode parasites of goats in Denmark. Vet Parasitol 1996; 66: 53-66.

312. Echevarria F, Borba MFS, Pinheiro AC, Waller PJ, Hansen JW. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America Brazil. Vet Parasitol 1996; 62:199-206.

313. Falzon LC, Menzies PI, Shakya KP, et al. Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario, Canada. Vet Parasitol 2013; 193: 150-162.

314. Robinson M, Trudgett A, Fairweather I, McFerran N. Benzimidazole binding to *Haemonchus contortus* tubulin: a question of structure. Trends Parasitol 2002; 18:153-154.

315. Barrere V, Falzon LC, Shakya KP, et al. Assessment of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* in sheep flocks in Ontario, Canada: comparison of detection methods for drug resistance. Vet Parasitol 2013;198:159-65.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE

ETİK KURULUN ADı : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ETİK KURULUN ADRESİ : Erc.Üni. Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi

Tarih: 09.05.2012 **Toplantı Sayısı:** 05 **Karar No:** 12/61

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul **09.05.2012** tarihinde

Prof.Dr.Harun ÜLGER Başkanlığı'nda toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Unvanı	Bölümü	İmza
Harun Ülger	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Abdullah İnci	Prof. Dr.	Vet. Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Prof. Dr.	Ecz. Fakültesi	
Coşkun Tez	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Füsun F. Erdoğan	Doç. Dr	Tıp Fakültesi	
Serpil Sarıözkan	Doç. Dr.	DEKAM	
M. Betül Aycan	Yrd. Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Ahmet Öztürk	Yrd. Doç. Dr	Tıp Fakültesi	
Asiye Gökbelen	Yar. Sevenler Der. Baş.	Sivil top. kuruluşu temsilcisi	
Serap A. Eroğlu	Avukat	Kurumla ilişkisi olmayan üye	

Üniversitemiz Tıp Fakültesinden **Doç.Dr.Alparslan YILDIRIM** tarafından sunulan **"Koyunlarda Haemonchus contortus'un Moleküler Karekterizasyonu ve Benzimidazol Dirençliliğinin Moleküler Olarak Araştırılması"** adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

ASLININ AYNIDIR
Prof. Dr. Harun ÜLGER
Erciyes Üniversitesi
Hayvan Deneyleri
Yerel Etik Kurul Başkanı

Tarih : 09.05.2012

Etik Kurul Başkanı : Prof.Dr.Harun ÜLGER

İmzası :

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Zuhal ÖNDER

Uyruğu: (T.C.)

Doğum Tarihi ve Yeri: 1 Ocak 1982, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 553 2543525

email: zuhalbiskin@erciyes.edu.tr

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

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lise	Atatürk Lisesi	1999
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi	2004
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Parazitoloji	2009

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2010	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı	Öğretim Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce