

- 1 -

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

**SIĞIRLARDAN TOPLANMIŞ IXODID KENELERDE ANAPLASMA
PHAGOCYTOPHILUM’UN REAL TIME PCR’LA ARAŞTIRILMASI VE
SAPTANAN İZOLATLARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan
Ömer TÜRKMEN**

**Danışman
Doç. Dr. Önder DÜZLÜ**

Yüksek Lisans Tezi

**Nisan 2016
KAYSERİ**

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

**SIĞIRLARDAN TOPLANMIŞ IXODID KENELERDE ANAPLASMA
PHAGOCYTOPHILUM’UN REAL TIME PCR’LA ARAŞTIRILMASI VE
SAPTANAN İZOLATLARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan
Ömer TÜRKMEN**

**Danışman
Doç. Dr. Önder DÜZLÜ**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2014-5506 kodlu projeyle desteklenmiştir.**

**Nisan 2016
KAYSERİ**

II

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 çalışmada özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Ömer TÜRKMEN

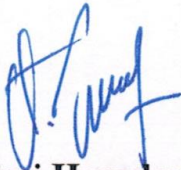
İmza :



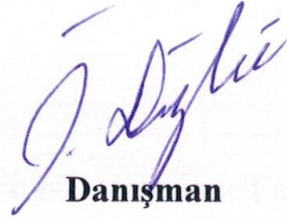
III

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

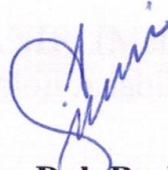
“Sığırlardan Toplanmış Ixodid Kenelerde *Anaplasma phagocytophilum*’un Real Time PCR’la Araştırılması ve Saptanan İzolatların Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı yüksek lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Tezi Hazırlayan**

Ömer TÜRKMEN

**Danışman**

Doç. Dr. Önder DÜZLÜ

**Anabilim Dalı Başkanı**

Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Doç. Dr. Önder DÜZLÜ danışmanlığında Ömer TÜRKMEN tarafından hazırlanan “Sığırlardan Toplanmış Ixodid Kenelerde *Anaplasma phagocytophilum*’un Real Time PCR’la Araştırılması ve Saptanan İzolatların Moleküler Karakterizasyonu” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

08/04/2016

JÜRİ**İmza**

Danışman :Doç. Dr. Önder DÜZLÜ (Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

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

Üye :Doç. Dr. Ramazan ADANIR (Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Burdur)

ONAY

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

05/05/2016

Prof. Dr. Aykut OZDARENDELİ
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımın her aşamasında bilgi birikimiyle bana her zaman yol gösteren, ilgi ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Önder DÜZLÜ'ye, her türlü bilgi birikimlerinden yararlandığım hocalarım Prof. Dr. Abdullah İNCİ ve Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM'a, laboratuvar çalışmalarında desteğini aldığım Öğr. Gör. Dr. Zuhale ÖNDER ve Araş. Gör. Arif ÇİLOĞLU'na, maddi ve manevi yönden desteklerini her zaman hissettiğim sevgili aileme ve yüksek lisans tezim süresince malzeme bazında TYL-2014-5506 kodlu projeyle destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürü borç bilirim.

Ömer TÜRKMEN
Kayseri, Nisan 2016

**SIĞIRLARDAN TOPLANMIŞ IXODİD KENELERDE ANAPLASMA
PHAGOCYTOPHILUM’UN REAL TIME PCR’LA ARAŞTIRILMASI VE
SAPTANAN İZOLATLARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Ömer TÜRKMEN

T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Nisan 2016

Danışman: Doç. Dr. Önder DÜZLÜ

ÖZET

Bu çalışma, Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış ixodid kenelerde *Anaplasma phagocytophilum*’un Real Time PCR’la araştırılması ve pozitif izolatların 16S rRNA gen bölgesi yönünden karakterize edilmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen TYL-2014-5506 kodlu araştırma projesi kapsamında, Nisan-Eylül 2015 tarihleri arasında araştırma yöresindeki sığırlardan toplanmış toplam 265 ergin ixodid keneden (60 *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, 21 *Haemaphysalis parva*, 53 *Hyalomma marginatum*, 32 *H. anatolicum*, 36 *H. excavatum*, 30 *H. detritum*, 25 *Rh. turanicus*, 8 *Rh. bursa*) genomik DNA ekstrakte edilmiştir. DNA ekstraksiyonunu takiben 16S rRNA gen bölgesinin yaklaşık 641 bp’lik kısmını amplifiye eden *Anaplasma phagocytophilum* spesifik primerlerle nested PCR analizleri yapılmıştır. Real Time PCR’la bireysel olarak incelemesi yapılan örneklerden bir *Hyalomma marginatum* ve bir *Rhipicephalus turanicus* örneğinde pozitiflik saptanmıştır. Pozitif izolatlara (TRaphagHmar ve TRaphagRtur) ait amplikonlar nested PCR primerleri ile klonlanmış ve plasmid pürifikasyonundan sonra sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA dizilerinin GenBank kayıtları gerçekleştirilmiş (KU925346-KU925347) ve GenBank’ta kayıtlı mevcut diğer bazı *A. phagocytophilum* suşları ile ikili analizleri ve çoklu hizalamaları yapılarak filogenisi araştırılmıştır. Filogenetik analiz sonucu Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış *Hyalomma marginatum* ve *Rhipicephalus turanicus* örneklerinde belirlenen *A. phagocytophilum* izolatları ile Dünya’da ve Türkiye’den daha önce GenBank’a girilmiş izolatların 3 ana dalda (A, B ve C kümeleri) kümelendikleri belirlenmiştir. A ve B gruplarındaki *A. phagocytophilum* izolatlarının homolog oldukları, C grubunda yer alan izolatların ise kendi aralarında ortalama %0,2’lik genetik farklılığın bulunduğu belirlenmiştir. Gruplar arasındaki genetik

farklılıklara bakıldığında; A grubundaki izolatların B grubundakilerle $10,8 \pm 2,0$, C grubundakilerle ise $13,0 \pm 2,7$; B grubundaki izolatların C grubundaki izolatlarla arasındaki ortalama genetik farklılık $13,8 \pm 2,8$ saptanmıştır. TRAphagHmar ve TRAphagRtur izolatlarının kendi aralarında %100 identik oldukları tespit edilmiştir. TRAphagHmar ve TRAphagRtur izolatlarının, Türkiye’den daha önce girilmiş ve *Ixodes ricinus* kenelerinden elde edilmiş 9-08 (AB604782), 73-08 (AB604783) ve 208-08 (AB604784) izolatlarıyla (C grubunda) arasındaki genetik farklılığın sırasıyla %0,09, %0,05 ve %0,58 olduğu tespit edilmiştir. Türkiye’den daha önce girilmiş ve koyun ve keçilerden elde edilmiş UK 40 (KJ183079), C139 (KF459965), EKY 144 (JF807995) ve EKY 155 (JF807994) izolatlarıyla (C grubunda) TRAphagHmar ve TRAphagRtur izolatları arasındaki genetik farklılık ise %0,09 saptanmıştır. A grubunda yer alan ve Türkiye’den sığır, köpek ve *Haemaphysalis sulcata* ile türü belirtilmemiş keneden girilmiş Trbrt45 (KP745629), 10100 (JN656375), H116 (KF034787) ve HS56 (KJ195692) izolatlarıyla TRAphagHmar ve TRAphagRtur arasındaki genetik farklılık da ilk üç izolat için $13,26$ ve sonuncu HS56 izolatı için ise $13,66$ olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış kene örneklerinde *A. phagocytophilum*’un moleküler yaygınlığı ve genetik karakterleri hakkında bilimsel veriler elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Anaplasma phagocytophilum*, kene, moleküler karakterizasyon, Kayseri, 16S rRNA

**INVESTIGATION OF *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* IN IXODID TICKS
COLLECTED FROM CATTLE BY REAL TIME PCR AND MOLECULAR
CHARACTERIZATIONS OF THE ISOLATES**

Ömer TÜRKMEN

Erciyes University, Graduate School of Health Science

Department of Veterinary Parasitology

M. Sc. Thesis, April 2016

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Onder DUZLU

ABSTRACT

This study was performed to investigate *Anaplasma phagocytophilum* in the ixodid ticks collected from cattle in Kayseri province by Real Time PCR and to genotype the positive isolates related to 16S rRNA gene region. For this aim, a total of 265 adult ixodid ticks (60 *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, 21 *Haemaphysalis parva*, 53 *Hyalomma marginatum*, 32 *H. anatolicum*, 36 *H. excavatum*, 30 *H. detritum*, 25 *Rh. turanicus*, 8 *Rh. bursa*) were collected from the study area between April-September 2015 within the scope of research Project (No:TYL-2014-5506) supported by Erciyes University Research Fund and genomic DNA was extracted from the specimens. Following the DNA extraction, nested PCR analyses were individually carried out with *Anaplasma phagocytophilum* specific primers amplifying an approximately 641 bp region of 16S rRNA gene. *Anaplasma phagocytophilum* positivity was determined in one *Hyalomma marginatum* and one *Rhipicephalus turanicus* samples by Real Time PCR analyses. The amplicons belonging to positive isolates (TRaphagHmar and TRaphagRtur) were cloned and sequenced following the plasmid purification. The obtained DNAs were deposited to GenBank (KU925346-KU925347) and pairwise analyses of the sequences and multiple alignments with some other *A. phagocytophilum* strains available in the GenBank were performed and phylogenies were investigated. The phylogenetic analyses revealed that the *Hyalomma marginatum* and *Rhipicephalus turanicus* isolates clustered in 3 main groups (A, B, and C groups) together with the isolates from Turkey and the world available in GenBank. While A and B groups were found homolog, the isolates in group C showed 0.2% genetic difference amongst themselves. According to the genetic differences in groups, the genetic differences between group A and B, group A and C, and group B and C were found as $10.8 \pm 2.0\%$, $13.0 \pm 2.7\%$, and $13.8 \pm 2.8\%$, respectively. TRaphagHmar and TRaphagRtur isolates

were found as 100.0% identical within each other. The genetic differences of TRAphagHmar and TRAphagRtur isolates with the prior *Ixodes ricinus* tick isolates 9-08 (AB604782), 73-08 (AB604783) and 208-08 (AB604784) in group C from Turkey were determined as 0.09%, 0.05% and 0.58%, respectively. The genetic differences amongst TRAphagHmar and TRAphagRtur isolates and the prior sheep and goat isolates UK 40 (KJ183079), C139 (KF459965), EKY 144 (JF807995) and EKY 155 (JF807994) in group C from Turkey were detected as 0.09%. In addition the genetic differences amongst TRAphagHmar and TRAphagRtur isolates and the prior cattle, dog, *Haemaphysalis sulcata* and an unremarked tick species isolates Trbrt45 (KP745629), 10100 (JN656375), H116 (KF034787) and HS56 (KJ195692) in group A from Turkey were found as 13.26% for first three isolates and 13.66% for the last HS56 isolate.

In conclusion, the scientific data were obtained with this study about the molecular prevalence and genetic characters of *A. phagocytophilum* in tick species in Kayseri province.

Key words: *Anaplasma phagocytophilum*, tick, molecular characterization, Kayseri, 16S rRNA

İÇİNDEKİLER

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
TABLolar LİSTESİ	XII
ŞEKİLLER LİSTESİ	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 'un Sınıflandırmadaki Yeri.....	3
2.2. Anaplasmosis'in Türkiye'deki Yayılışı	4
2.3. Anaplasmosis'in Dünyadaki Yayılışı.....	4
2.4. Hastalık Etkeninin Yaşam Döngüsü ve Çoğalması	5
2.5. Patogenez	7
2.6. Klinik Belirtiler	9
2.7. Hastalığın Tanısı	9
2.8. Genomik ve Antijenik Yapı	10
2.9. İmmünite	12
2.10. Tedavi.....	13
2.11. Korunma ve Kontrol	14
2.12. Ekonomik Önemi	15
2.13. Zoonotik Önemi	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Araştırma Sahası ve Kene Örneklerinin Toplanması.....	16
3.2. Laboratuvar Çalışmaları.....	16
3.2.1. Kene Örneklerinin Tür Teşhisleri	16
3.2.2. DNA Ekstraksiyonu ve Konsantrasyonların Belirlenmesi.....	17
3.2.3. Real Time PCR Analizleri	18
3.2.4. DNA Amplifikasyonu ve Elektroforez	19

3.2.5. Jelden Ekstraksiyon İşlemi.....	20
3.2.6. 16S rRNA Geninin Klonlanması ve Plasmid İzolasyonu	22
3.2.4.1. Ligasyon basamağı.....	22
3.2.4.2. Transformasyon Basamağı.....	23
3.2.4.3. Koloni Screening PCR	24
3.2.4.4. Plasmid DNA	24
3.2.7. Klonlanan 16S rRNA Geninin Tür Tayini için Sekans ve Filogenetik Analizleri.....	26
4. BULGULAR	27
4.1. İdentifiye Edilen Kene Türleri	27
4.2. Real Time PCR Sonuçları	31
4.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyon Sonuçları	32
4.4. 16S rRNA Gen Bölgesinin Klonlama Sonuçları.....	32
4.5. 16S rRNA Geninin Sekans ve Filogenetik Analizleri.....	35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
6. KAYNAKLAR	61
ETİK KURUL KARARI	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Sığırlarda anaplasmosis'in tedavisinde kullanılan preparatlar.....	14
Tablo 3.1. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 'un 16S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler.....	19
Tablo 4.1. Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış kene örneklerinde belirlenen <i>A. phagocytophilum</i> izolatlarının gen bölgesi, izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları.....	36
Tablo 4.2. Dünyadan ve Türkiye'den filogenetik kıyaslaması yapılan diğer bazı <i>A. phagocytophilum</i> izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler	38
Tablo 4.3. Çoklu hizalamaları yapılan <i>A. phagocytophilum</i> pozitif izolatlar ve Dünyadan ve Türkiye'den diğer bazı <i>A. phagocytophilum</i> izolatlarının nükleotid kompozisyonları.....	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Eritrositlerde <i>A. A. centrale</i> , <i>B. A. marginale</i> etkenleri.....	6
Şekil 2.2.	<i>Anaplasma</i> türlerinin hayat siklusu	7
Şekil 3.1.	Araştırma sahası.	16
Şekil 3.2.	Elektroforez tankına amplikonların yüklenmesi	20
Şekil 3.3.	pJET1.2/blunt klonlama vektörü	23
Şekil 3.4.	LB katı besi yeri hazırlanma prosedürü	23
Şekil 3.5.	LB katı besi yerinde üreyen koloniler	24
Şekil 3.6.	LB katı besi yerinden alınan kolonilerin ampisilinli LB sıvı besi yerlerine ekimi ve 37°C’de sallayıcı üzerinde inkubasyonu.....	25
Şekil 4.1.	Ergin dişi <i>Hyalomma detritum</i>	27
Şekil 4.2.	Ergin erkek ve dişi <i>Hyalomma marginatum</i>	28
Şekil 4.3.	Ergin erkek ve dişi <i>Hyalomma anatolicum</i>	28
Şekil 4.4.	Ergin erkek ve dişi <i>Hyalomma excavatum</i>	29
Şekil 4.5.	Ergin erkek ve dişi <i>Haemaphysalis parva</i>	29
Şekil 4.6.	Ergin erkek ve dişi <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) turanicus</i>	30
Şekil 4.7.	Ergin erkek ve dişi <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) bursa</i>	30
Şekil 4.8.	Ergin erkek ve dişi <i>Rhipicephalus (Boophilus) annulatus</i>	31
Şekil 4.9.	Sığırlardan toplanmış kene DNA’larında <i>A. phagocytophilum</i> yönünden TaqMan prob bazlı Real Time PCR analiz sonuçları.....	31
Şekil 4.10.	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> izolatlarının parsiyel 16S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü	32
Şekil 4.11.	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> izolatlarının jel pürifikasyonu sonrası amplikonların jel elektroforezde görünümü	33
Şekil 4.12.	Transformasyon sonucu besi yerinde oluşan koloniler	34
Şekil 4.13.	Transformasyon basamağında 2. inkübasyon basamağı sonucu oluşan koloniler.....	34
Şekil 4.14.	Transforme hücrelerde 16S rRNA gen bölgesinin koloni PCR’ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü	35
Şekil 4.15.	TRApHagHmar izolatının parsiyel 16S rRNA gen bölgesi nükleotit ve aminoasit dizilimleri (KU925346)	36
Şekil 4.16.	TRApHagRtur izolatının parsiyel 16S rRNA gen bölgesi nükleotit ve	

aminoasit dizilimleri (KU925347)	37
Şekil 4.17. Kene örneklerinde pozitif belirlenen <i>A. phagocytophilum</i> izolatları ile Dünya'dan ve Türkiye'den analizleri yapılan diğer bazı izolatların 16S rRNA gen dizilimlerinin pairwise analizleri	41
Şekil 4.18. Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış örneklerinde belirlenen <i>A. phagocytophilum</i> izolatları ile Dünya'daki ve Türkiye'deki diğer bazı <i>A. phagocytophilum</i> izolatlarının partial 16S rRNA gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları	50
Şekil 4.19. Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanan kene örneklerinde saptanan <i>A. phagocytophilum</i> izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer <i>A. phagocytophilum</i> izolatlarının 16S rRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları.....	52

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Rickettsiales dizisi, Anaplasmataceae ailesindeki *Anaplasma* türlerinin meydana getirdiği anaplasmosis, tropik ve subtropik iklim kuşağındaki bölgelerdeki memeli hayvanlarda görülen ve büyük ekonomik kayıplara neden olan enfeksiyöz bir hastalıktır. Hastalık sığırlarda eritrositlerin yıkımına sebep olmaktadır. Anaplasmosis sığırlara vektör keneler tarafından biyolojik olarak nakledilmekte olup bazı kan emici sinekler de *Anaplasma* türlerini mekanik olarak nakledebilmektedir. Ayrıca enjektörler, kulak küpeleri, boynuz kesme veya kastrasyon ekipmanları gibi kanla kontamine cisimler de sığırlar arasında anaplasmosis'in yayılmasına sebep olabilmektedir. Bazı durumlarda transplasental bulaşma da görülebilmektedir. Bütün yaş grubundaki sığırlar anaplasmosis'e karşı duyarlıdır. Sığırlarda anaplasmosis'e yol açan türler *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum* ve *A. bovis*'tir. *A. phagocytophilum* önceleri *Ehrlichia phagocytophila*, *E. equi* ve insan granulositik ehrlichiosis etkeni olarak bilinmekteydi. Aynı şekilde *A. bovis* de *E. bovis* olarak sınıflandırılmaktaydı. Ancak son yıllarda taksonomik çalışmalar ışığında bu her iki tür *A. phagocytophilum* ve *A. bovis* olarak isimlendirilmektedir. Anaplasmosis sığırlarda anemi, ikterus, yüksek ateş, öksürük gibi klinik semptomlarla seyretmekte olup yavru atımına ve verim kayıplarına da yol açarak büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (1-3).

Bu çalışmada, *A. phagocytophilum* türlerinin sadece vektörlüğü kanıtlanmış *Ixodes* türleriyle değil, onlara ilaveten farklı diğer ixodid keneler tarafından da taşınabilecekleri hipotez edilmiştir. Bu hipotez ile Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış vektör ixodid kenelerde zoonotik karakterli *Anaplasma phagocytophilum*'un, sensitivite ve spesifitesi diğer moleküler teşhis yöntemlerine göre çok daha yüksek olan real time PCR ile araştırılması ve elde edilen pozitif izolatların 16S rRNA gen bölgesinin

karakterize edilip moleküler genotiplendirilmesinin yapılarak GenBank kayıtlarının gerçekleştirilmesi ve GenBank'ta Türkiye'den ve dünyadan daha önce bildirilmiş mevcut bazı *A. phagocytophilum* izolatlarıyla olan filogenetik yakınlıklarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Anaplasma phagocytophilum*’un Sınıflandırmadaki Yeri

Anaplasma phagocytophilum’un Systema Naturae 2000’e göre sistematikteki yerleri aşağıdaki gibidir (4).

Biota

Domain: "**Bacteria**" (Haeckel 1894) C.R. Woese et al. 1990

Phylum: "**Proteobacteria**" Garrity et al. 2005

Class: **Alphaproteobacteria** Garrity et al. 2006

Order: **Rickettsiales** Gieszczykiewicz 1939

Family: **Anaplasmataceae** Philip 1957

Genus: **Anaplasma**^T Theiler 1910

Anaplasma phagocytophilum (Foggie 1949) Dumler et al. 2001

Anaplasma centrale (Theiler 1911) Ristic&Kreier 1984

Anaplasma marginale Theiler 1910

Anaplasma bovis (Donatien&Lestoquard 1936)Dumler et al 2011

Anaplasma ovis Lestoquard 1924

Anaplasma caudatum (Kreier &Ristic 1963) Ristic&Kreier 1984

Anaplasma platys Dumler et al. 2001

2.2. Anaplasmosis'in Türkiye'deki Yayılışı

Türkiye'de sığırlarda anaplasmosis konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır. Yapılan az sayıdaki çalışmada mikroskobik, serolojik ve son yıllarda moleküler olarak sığırlarda *Anaplasma* türlerinin varlığı ortaya konulmuştur. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi çiftliğinde yapılan bir araştırmada mikroskobik olarak 17 sığırdan anaplasmosis teşhisi konulduğu belirtilmektedir (5). Birdane ve ark. (6)'nin 645 sığır üzerinde yaptığı bir araştırmada sığırların mikroskobik olarak %34,11'nin, serolojik olarak ise %55,35'nin *A. marginale* yönünden pozitif olduğu rapor edilmektedir. Yapılan bir diğer çalışmada sığırlarda anaplasmosis yönünden serolojik olarak cELISA ve IFA testlerinin kıyaslaması yapılmıştır (7). Bu çalışmada 484 sığırın 69'nun mikroskobik olarak, 287'sinin de serolojik olarak *A. marginale* yönünden pozitif olduğu bildirilmektedir. Bir başka çalışmada doğal olarak *A. marginale* ile enfekte ineklerde akut faz proteinleri, klinik, hematolojik ve biyokimyasal parametrelere bakılmıştır (8). Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalarda hem sığırlarda hem de vektör kenelerde anaplasmosis yönünden araştırmalar yapılmıştır. Aktas ve ark. (9), 389 sığır üzerinde yaptıkları moleküler çalışmada *Anaplasma* enfeksiyonlarını %9 olarak bildirmektedirler. Bu çalışmada sığırlarda anaplasmosis'e yol açan türlerin moleküler prevalansının ise %2,8 *A. marginale*, %1 *A. centrale* ve %1 *A. phagocytophilum* olduğu belirtilmektedir. Moleküler olarak vektör keneler üzerinde yapılan çalışmalarda; Karadeniz Bölgesi'nden toplanan kenelerde *A. phagocytophilum* prevalansı %11,6 olarak rapor edilmektedir (10). Aynı bölgede keneler üzerine yapılan bir başka moleküler çalışmada ise kenelerin %6,78'nin *A. phagocytophilum*, %6,56'sının ise *A. centrale* ile enfekte olduğu saptanmıştır (11). Trakya bölgesinde keneler üzerine yapılan bir diğer moleküler çalışmada *A. phagocytophilum*'un İstanbul'da %2,7, Kırklareli'nde ise %17,5 olduğu tespit edilmiştir (12).

2.3. Anaplasmosis'in Dünyadaki Yayılışı

Anaplasmosis'in Dünya'daki prevalansına bakıldığında bu hastalığın özellikle Amerika kıtasında çok önemli ve yaygın olduğu görülmektedir. Tüm Dünya'da yapılan çalışmaların çoğu seroprevalans çalışmaları olup moleküler çalışmaların genellikle prevalans çalışması yerine genetik karakterizasyon çalışmaları şeklinde olduğu gözlenmektedir. Az sayıda yapılan mikroskobik çalışmada sığırlarda

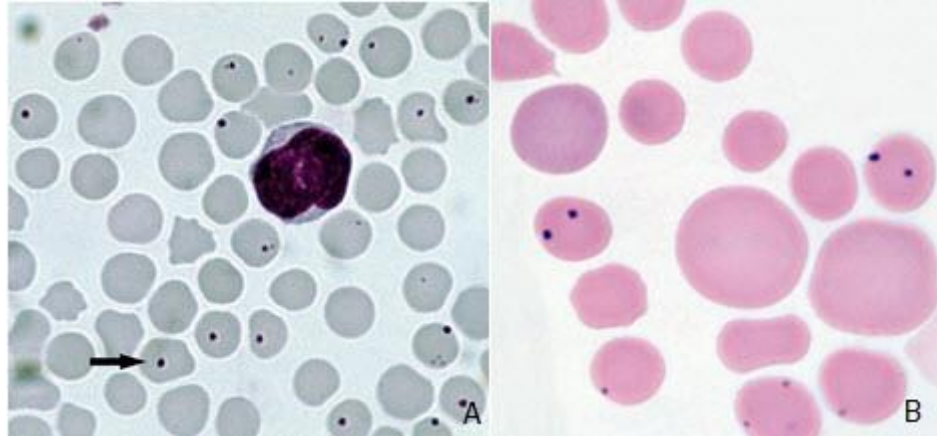
anaplasmosis'in mikroskobik prevalansı; Amerika Birleşik Devletleri'nde (A.B.D) %4,8-29 (13), İran'da %80,3 (14), Cezayir'de %7,4 (15) ve Suudi Arabistan'da %0,98 (16) olarak rapor edilmektedir.

Serolojik prevalans çalışmalarında sığırlarda anaplasmosis'in prevalansı; Macaristan'da %80,8 (17), İsviçre'de %95 (18), İtalya'da %11,5 (19), Avusturya'da %2,1 (20), Malezya'da %77,6 (21), Mozambik'te %63-76,5 (22, 23), Kosta Rika'da %37,2 (24), A.B.D'de %7,1-15,17 (25-28), Porto Riko'da %22-27,4 (29, 30), Brezilya'da %58,74-97 (31, 32), Guetamala'da %87,5 (33), Meksika'da %54,6-69,75 (34, 35), Bolivya'da %6-32 (36), Venezuela'da %47 (37), Küba'da %43 (38), Paraguay'da %92 (39), Kenya'da %58 (40), Güney Afrika'da %26-98,6 (41-44), Sudan'da %6,1-38,9 (45, 46), Tanzanya'da %20-37 (47) ve Zambiya'da %14,7-38,6 (48) olarak bildirilmektedir.

Moleküler çalışmalar genellikle karakterizasyon çalışması şeklinde olup az sayıdaki moleküler prevalans çalışmasına göre sığırlarda anaplasmosis yaygınlığı; Hindistan'da %45,2 (49), Macaristan'da %92 (50), A.B.D'de %57,1-92,8 (13) ve Meksika'da %69,2 (34) olarak belirtilmektedir.

2.4. Hastalık Etkeninin Yaşam Döngüsü ve Çoğalması

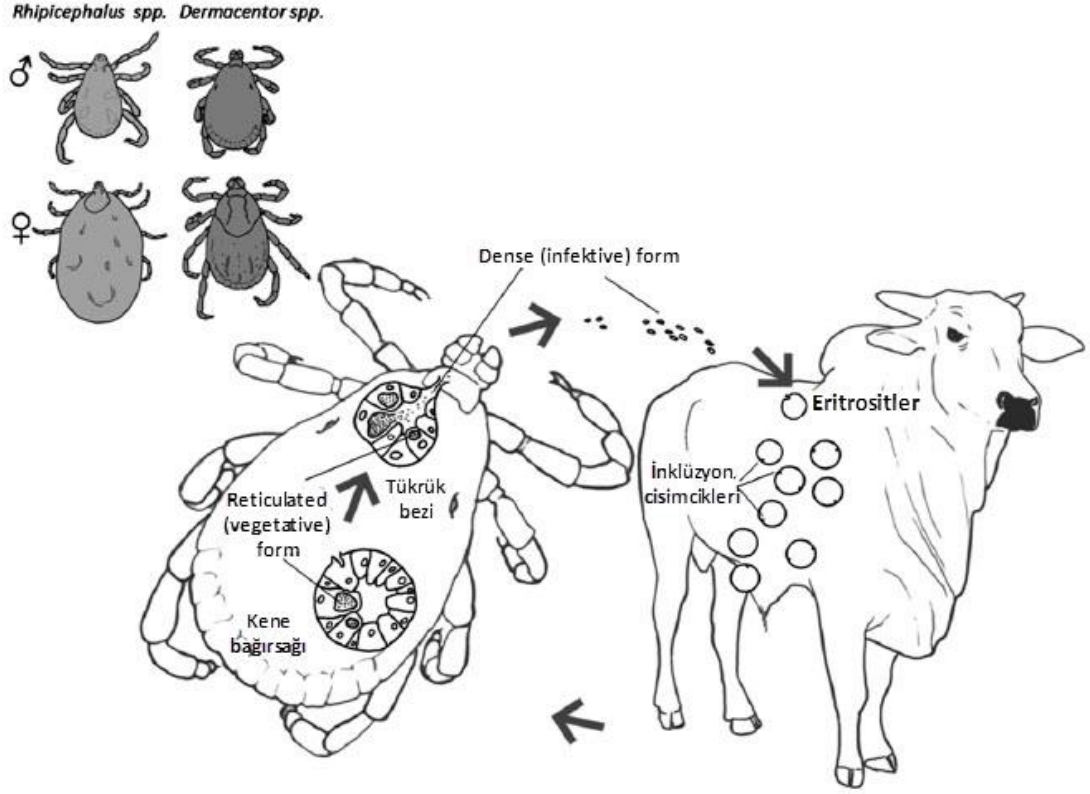
Sığırlarda anaplasmosis etkenleri *A. marginale*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum* ve *A. bovis*'tir. Bu *Anaplasma* türleri; *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Ixodes* ve *Hyalomma* soylarındaki ixodid keneler ve *Argas*, *Ornithodoros* soylarındaki argasid keneler tarafından biyolojik olarak nakledilmektedirler. Ayrıca kan emen bazı sinek türleri (Tabanid'ler ve *Stomoxys* türleri vb.) anaplasmosis'i mekanik olarak da nakledebilmektedir. *Anaplasma* türleri eritrositlerin içerisine yerleşmekte olup morfolojik olarak yaklaşık 0,3-1,0 µm çapında, yuvarlak nokta şeklindedirler. Sığırlarda en patojenik ve en yaygın *Anaplasma* türü olan *A. marginale* özellikle eritrosit duvarına yakın bölgelerde yerleşim gösterirken, *A. centrale* ise eritrositlerin merkezinde veya merkeze yakın bölgelerde yerleşmektedir (Şekil 2.1) (1-3, 51, 52).



Şekil 2.1. Eritrositlerde A. A. centrale, B. A. marginale etkenleri (53)

Sığırlarda anaplasmosis'e yol açan diğer türlerden *A. phagocytophilum* önceleri *Ehrlichia phagocytophila*, *E. equi* ve insan granulositik ehrlichiosis etkeni olarak bilinmekteydi. *A. marginale* ve *A. centrale*'ye oranla, *A. marginale*'ye filogenetik olarak çok daha yakın olan *A. bovis* de önceleri *E. bovis* olarak sınıflandırılmaktaydı (1-3, 51, 52).

Anaplasma türleri biyolojik olarak bazı Ixodid ve Argasid kene türleri tarafından nakledilmekte olup kan emen bazı sinek türleri tarafından mekanik olarak da nakledilebilmektedir. *Anaplasma* türleri biyolojik olarak keneler tarafından transstadial olarak nakledilmekte olup transovarial nakil bildirilmemiştir. *Anaplasma* türlerinin yaşam siklusları oldukça kompleks olup kenelerin beslenme sikluslarıyla alakalıdır. Keneler, *Anaplasma* türleriyle enfekte konaklardan kan emmeleri esnasında enfekte eritrositleri almaktadırlar. Kenelerde enfeksiyonun ilk basamağı kene bağırsak hücrelerinde meydana gelmektedir. Keneler ikinci kez kan emdiklerinde kenelerin tükürük bezleri başta olmak üzere diğer birçok dokuları da enfekte olmaktadır (Şekil 2.2) (52, 54, 55).



Şekil 2.2. *Anaplasma* türlerinin hayat siklusu (55)

Anaplasma türlerinin hayat siklusunda reticulated ve dense formları olmak üzere iki form görülmektedir. Bu her iki form da enfekte kenenin hücrelerinde bulunmaktadır. Kene bağırsak hücrelerinde ilk önce reticulated formlar meydana gelmektedir. Bu formlar vejetatif basamak olup ikiye bölünmektedirler. Reticulated formların ikiye bölünmesiyle dense formları meydana gelmektedir. Dense formları ise enfektif formlar olup hücre dışında hayatta kalabilmektedirler. Keneler kan emmeleri esnasında tükürük bezlerindeki dense formlarını sağlıklı konaklara naklederek bu konakları da enfekte etmektedirler (52, 54, 55).

2.5. Patogenez

Anaplasmosis'in patogenezinde inkubasyon periyodu, gelişme, nekahat ve taşıyıcılık dönemi olmak üzere dört dönem bulunmaktadır. *Anaplasma* türlerinin keneler tarafından sığırlara nakledilmesinden sonra %1 parazitemi oluşuncaya kadar geçen süreyi kapsayan inkubasyon periyodu yaklaşık 3-8 hafta sürmektedir. Bu periyot boyunca sığırlar herhangi bir klinik semptom göstermemektedirler. Bu periyot sonunda parazitemi oranının yükselmesiyle birlikte enfekte eritrositler retikulo endotelial sistem (RES) hücreleri tarafından fagosit edilecek

parçalanmakta ve buna bağlı olarak da hayvanlarda klinik olarak anemi şekillenmektedir. Aneminin şekillenmesiyle başlayan gelişme dönemi 4-9 gün sürmekte olup RES hücrelerinin dolaşım sisteminde görülmesiyle sona ermektedir. Klinik semptomlar genellikle bu safhada şekillenmektedir. Bu dönemde parazitemiye bağlı olarak vücut ısısı 41-42 °C'ye yükselmektedir. Akut olaylarda sığırın mukozalarında anemi ve ikterus şekillenmektedir. Kan anemiden dolayı suludur. Anaplasmosis olgularında genellikle hemoglobüri görülmemektedir. Akut enfeksiyonlarda parazitemi düzeyi %10'dan %75'e kadar yükselebilir ve mikroskopik muayenede eritrositlerin kenarına lokalize olmuş bazofilik organizmler kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Bu safhadaki laboratuvar değerleri (PCV %5,0-15,0; total eritrosit sayısı, litrede 1,5-4 X 10⁶; total bilirubin, 100 ml de 2,0-7,0 mg; direkt bilirubin, 10 ml de 0,25-7,0 mg) ciddi hemolitik anemiye yansımaktadır. Perakut vakalarda, eritrositlerin yarıdan fazlası *Anaplasma* türleri tarafından istila edildiği için, genellikle 24 saat içinde ölüm görülmektedir. Vücut ısısı ölümden önceki saatlerde normalin altına düşmektedir (56-58).

Hastalıktan ölmeyip iyileşen hayvanlarda, kan değerlerinin normale dönmesi için, ortalama 3 aylık bir nekahat dönemi gerekmektedir. RES hücrelerinin ortaya çıkmasıyla başlayan nekahat dönemi kan değerlerinin normale dönmesiyle son bulmaktadır. Nekahat dönemine geçişin işareti olan eritropoiesis; perifer kanda retikülositleri, polikromatofilleri, bazofilik hücreleri, normoblastları, artmış hemoglobin ve lökositleri görerek belirlenmektedir. Anaplasmosis'den kaynaklanan ölümler, genellikle gelişme döneminin sonları ile nekahat döneminin başlarında görülmektedir. Hastalıkla ilgili otopsi bulgularında hemolitik anemi dikkati çekmektedir. Bütün dokular solgun ve kan suludur. Ölüm akut safhanın sonlarında meydana gelmişse sarılık da görülebilmektedir. Dalak genellikle büyük, yumuşak ve çok koyu kahverengindedir. Karaciğer de büyümüş, sarı-turuncu renkte ve benekli bir görünüm almıştır. Safra kesesi genişlemiştir. Mediastinal lenf düğümleri ile karaciğerin bölgesel lenf düğümlerinde orta derecede büyüme ve kahverengi görünüm dikkati çekmektedir. Klinik olarak iyileşen hayvanlar genellikle hayat boyu etkenin taşıyıcısı olarak kalırlar ve hastalık için rezervuar ödevi görmektedirler. Taşıyıcı hayvanlarda premünisyon şekillenmektedir (56-58).

2.6. Klinik Belirtiler

Anaplasmosis sığırlarda her yaşta görülebilmektedir. Ancak, yaşla birlikte hastalığın şiddeti ve ölüm oranı da yükselmektedir. Hastalık genellikle bir yaşına kadar hafif, 2-3 yaş arasında akut ve öldürücü, ileriki yaşlarda ise perakut ve öldürücü seyretmektedir. Anaplasmosis’de klinik belirtiler etkenin vektör kene tarafından konaklara verilmesini takiben 3-8 haftalık bir süre içerisinde ortaya çıkmaktadır. Anaplasmosis’li hayvanlardaki ilk klinik belirtiler, eritrositlerdeki yıkımlara bağlı olarak ortaya çıkan anemi ve 41,5-42 °C’ye ulaşan yüksek ateş olmaktadır. Başlangıçta müköz membranlar kırmızı olup eritrositik yıkımı takiben anemiye bağlı müköz membranlarda soluklaşma oluşmaktadır. Anemi çok hızlı bir şekilde meydana gelmekte ve yaklaşık olarak eritrositlerin %75’i birkaç gün içerisinde yıkıma uğramaktadır. Anaplasmosis’de hemoglobinüri görülmemektedir. Hasta hayvanlarda kilo kaybı ve süt veriminde azalmalar görülmektedir. Kan sulu ve akıcı olup, akut olgularda, 4-8 gün içerisinde ölüm görülebilmektedir. Akut vakalarda mortalite %30-50 arasında değişmektedir. Sığırlarda kondüsyon kaybı, iştahsızlık, zayıflama, dermansızlık, depresyon, dehidrasyon, konstipasyon, kalp vurumunda artış, solunum güçlüğü ve idrarın koyu sarı renkte olması gibi klinik belirtiler görülebilmektedir. Bazı durumlarda gebe hayvanlarda abortlar da görülebilmektedir (6, 59, 60).

2.7. Hastalığın Tanısı

Anaplasmosis’in teşhisinde klinik semptomlar şüpheleri artırabilmektedir. Ancak hastalığın teşhisi perifer kandan yapılmış ve Giemsa ile boyanmış preparatların mikroskopik incelenmesinde eritrositler içerisinde etkenlerin görülmesiyle yapılabilmektedir. Mikroskopik muayene ile taşıyıcı hayvanlarda etkenleri saptamak çok zordur. Taşıyıcı hayvanlarda anaplasmosis’in teşhisi amacıyla serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Anaplasmosis’in epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalarda birçok serolojik test kullanılabilmektedir. Bu serolojik testler arasında complement fixation (CF) testi, capillary agglutination assay testi, card agglutination test (CAT), indirect fluorescent antibody (IFA) testi, enzymelinked immunosorbent assays (ELISA) (cELISA, indirect ELISA ve dot ELISA) testleri yer almaktadır. Bu serolojik testlerden en çok kullanılanları cELISA ve CAT testleridir. Son yıllarda çok düşük seviyedeki parazitemiyi tespit edebilen nükleik asit tabanlı testler

anaplasmosis'in teşhisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla parazite ait DNA veya RNA'nın varlığını ortaya koymaya yarayan PCR, Nested PCR, Reverse line blotting (RLB) testi ve Real-Time PCR gibi moleküler testler anaplasmosis'in teşhisinde sıklıkla kullanılmaktadır (52).

2.8. Genomik ve Antijenik Yapı

Ribosomal RNA genleri bütün bakteri türleri arasında oldukça yüksek korunmuşluğa sahip genler olup moleküler çalışmalarda patojen türlerin identifikasyonlarının tespiti ve filogenetik karakterlerinin ortaya konması açısından en sık tercih edilen gen bölgeleridir (61). Birçok bakterinin rRNA genleri genom başına 15 kez tekrarlanan tek bir operonda sıralanmaktadır. Genlerin operondaki yerleşimi genellikle benzerdir (örn. 16S (*rrs*)-23S (*rrl*)-5S (*rrf*)). *A. phagocytophilum*'un genomunda diğer *Rickettsia* türlerine benzer olarak yalnızca tek bir sıra *rrf*, *rrs* ve *rrl* kopyası bulunmaktadır (61, 62).

16S rRNA gen fragmentleri vektörlerdeki ve rezervuarlardaki bakteri DNA'larının tespitinde kullanılmaktadır. 16S rRNA markerlarının etkinliğinin amplifiye edilen gen bölgesine göre farklılık gösterdiği birçok çalışmada rapor edilmiştir. İnsan kanındaki kene kaynaklı patojenlerin tanımlandığı ilk çalışmalardan biri Chen ve ark. (63) tarafından rapor edilmiştir. Araştırmacılar 16S rRNA gen bölgesini amplifiye eden modifiye universal eubacterial primerleri (POmod ve PC5) ve internal GE9f/GE10r primerlerini kullanarak iki basamaklı PCR ile yaklaşık 919 bp'lik bir DNA bant profili elde etmişlerdir. Bu metodun etkinliği düşük bulunmuş olup HGA'lı (human granulocytic ehrlichiosis) hastaların yalnızca %50'sinde bu yöntemle *A. phagocytophilum* tespit edilebilmiştir. Benzer sonuçlar Bakken ve ark. (64) ve Comer ve ark. (65) tarafından da rapor edilmiştir. Araştırmacılar 16S rRNA gen fragmentlerinin insan anaplasmosis'inin erken teşhisinde yüksek sensitiviteye sahip olmadığı görüşüne varmışlardır. Gerçek sonuçları yansıtmayan GE9f/GE10r primer çifti anaplasmosisin moleküler teşhisinde kullanılmış olup Slovenya'da ilk Avrupalı bir hastada *A. phagocytophilum* DNA'sının teşhisinde kullanılmıştır (66). İlerleyen yıllarda vektör ve rezervuarlarda *A. phagocytophilum*'un araştırılması amacıyla 16S rRNA gen bölgesini amplifiye eden ve yüksek sensitiviteye sahip yeni primerler geliştirilmiştir. Farklı primer çiftlerinin geliştirilmesi sonucu *A. phagocytophilum*'un farklı varyantları olduğu belirlenmiştir (AP-ha varyantları; AP-

variant 1, AP-variant 2, AP-variant 3 ve AP-variant 4) (61). *A. phagocytophilum* DNA'sının tespitinde PER1/PER2 (67, 68) ya da EHR747/EHR790 (69-72) gibi tek basamaklı PCR primerleri de bazen kullanılmaktadır.

Sığırlarda en patojen *Anaplasma* türü olan *A. marginale*'nin küçük genomu dairesel olup büyüklüğü yaklaşık 1,2-1,6 Mb'dır. *A. marginale*'de 6 yüzey proteini bulunmaktadır; *msp-1a*, *msp-1b*, *msp-2*, *msp-3*, *msp-4* ve *msp-5*. Bu proteinler, *Anaplasma* türlerinin konak hücrelerine tutunmalarında ve enfeksiyon oluşturma kabiliyetlerinde kritik bir öneme sahiptir. Bu proteinlerden *msp1a*, *msp4* ve *msp5* tek bir gen tarafından kodlanmaktayken, *msp-1b*, *msp-2* ve *msp-3* ise birçok gen tarafından kodlanabilmektedir. *Msp-1a* ve *msp-1b* formları *msp1* kompleksini oluşturmaktadır (52, 73-76).

Msp-1a proteini tek bir gen (*msp-1a* geni) tarafından kodlanmakta olup farklı coğrafik bölgelerdeki *A. marginale* izolatlarının identifikasyonlarında stabil bir genetik marker olarak kullanılabilir. *Msp-1a* geni, *Anaplasma* türlerinin hem sığırlarda hem de kenelerde çoğalması esnasında korunmuş bir bölge özelliği göstermektedir. Bu gen bölgesi gerek sığır eritrositlerine gerekse kene hücrelerine tutunabilme özelliği göstermektedir (52, 73-76).

Msp-1b proteini, en az iki gen tarafından (*msp-1b₁* ve *msp-1b₂*) kodlanmakta olup izolatlar arasında polimorfik bir özellik göstermektedir. Bu protein çok sayıda gen tarafından kodlanmasına rağmen *msp-1b₁* ve *msp-1b₂* antijenlerinin protein sekanslarında çok küçük miktarda varyasyonlar gözlenmektedir. *MSP1b* geni yalnızca konak eritrositlerine tutunabilme özelliğinde olup kene hücrelerine adezyon gösterememektedir (52, 73-76).

Msp-2 ve *msp-3* proteinleri çok fazla sayıda gen tarafından kodlanmaktadır. *Msp-2* sekans ve antijenik kompozisyonu *Anaplasma* türlerinin hem sığırlarda hem de kenedeki hayat siklusları süresince değişiklik gösterebilmektedir. *Msp-2* geni polimorfik özellikte olup *A. marginale*'nin hem sığır eritrositlerindeki hem de kene tükürük bezi hücrelerindeki birçok aminoasit sekansını kodlayabilmektedir. *MSP3* geni de farklı coğrafik bölgelerdeki izolatlar arasında antijenik farklılıklar gösterebilmektedir. *Msp-2* ve *msp-3*, sığırların *A. marginale*'ye karşı gösterdiği immun yanıtın indüksiyonunda görev almaktadır. *Msp-4* ve *msp-5* tek bir gen tarafından kodlanmaktadır. *Msp-4* oldukça korunmuş bir bölgedir. *Msp-5* proteini de

çok korunmuş bir bölge olup cELISA testinde diagnostik antijen olarak etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Son yıllarda *A. marginale*'de yüzey proteinlerini kodlayan *msp-2* operon bağlantılı [operon-associated genes (OpAG)] 3 gen (OpAG1, OpAG2 ve OpAG3) identifiye edilmiştir. Bunun yanında *A. marginale*'de 20'den fazla outer membrane proteini (omp) bulunmaktadır (52, 73-76).

Anaplasma phagocytophilum'da en dominant protein *msp-2* genidir (62, 77). *Msp-2* gen bölgesi yüksek variabilite göstermesi açısından tür içerisindeki varyasyonların belirlenmesinde etkin şekilde kullanılmaktadır. *Msp2* gen bölgesini amplifiye eden primerler Barbet ve ark. (77) tarafından rapor edilmiştir. Bu primerler bütün *A. phagocytophilum* Amerika suşlarının tespitinde başarılı bir şekilde kullanılabilirken, Avrupa suşlarının belirlenmesinde ise etkisiz kalmaktadır. Bundan dolayı araştırmacılar (78) Avrupa suşlarının belirlenmesi amacıyla yeni primerler dizayn etmişlerdir.

Anaplasma phagocytophilum'un teşhisinde kullanılan bir başka gen bölgesi olan *ankA* proteini etkenin sitoplazmasında lokalizedir. Bu protein enfeksiyon süresinde ökaryotik konak hücrelerine transfer olmaktadır. Böylece *A. phagocytophilum* konak nötrofillerini manüple edebilmektedir (61, 79). Bu proteini amplifiye eden birçok primer çifti dizayn edilmiştir; yaklaşık 444 bp'lik gen bölgesini amplifiye eden LA1/LA6 primerleri (79, 80), iki basamaklı PCR'da kullanılan ve yaklaşık 667 bp'lik bölgeyi çoğaltan ANK-F1/ANK-R1 ve ANK-F2/ANK-R2 primerleri (68).

Walls ve ark. (80) *A. phagocytophilum* DNA'sının belirlenmesinde *ankA* gen bölgesinin 16S rRNA (GE9f/GE10r primerleri kullanılarak) gen bölgesine oranla daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak birçok araştırmacıya göre ise 16S rRNA gen bölgesinin *A. phagocytophilum* DNA'sının saptanmasında diğer gen bölgelerine oranla daha etkili olduğu rapor edilmiştir (9, 81-83).

2.9. İmmünite

Anaplasmosis'e karşı immunitenin mekanizması henüz tamamen izah edilememiş olup anaplasmosis'e karşı purifiye OM kullanılarak immunize edilen sığırlarda koruyucu immun yanıtın, IFN- γ üretimi ve proliferasyonu ile IgG2 üretimini içine alan OMP'ye özgü CD4⁺ T hücre yanıtıyla alakalı olduğu bildirilmektedir. İmmunize edilmemiş enfekte sığırlarda CD4⁺ T hücreleriyle alakalı olarak yüksek seviyelerde OMP spesifik IgG1 ve IgG2 üretimi görülmektedir. Enfeksiyon

süresince *Anaplasma* türlerinin MSP2 ve MSP3 proteinlerinde sürekli olarak antijenik varyasyonlar şekillenmektedir. Bu varyasyonlara karşı varyant spesifik IgG2 yanıtı oluşmaktadır. IgG2 immün yanıtı yeni oluşan varyantları kontrol edebilmekte, fakat patojenlerin elimine edilmesinde başarısız kalmaktadır. Çünkü yeni oluşan varyantlar sürekli olarak immün yanıtı kaçırmaktadır. Bu nedenle antijen spesifik CD4+ T lenfositlerin sayısı ve IFN- γ sekresyonu artmaktadır. IgG2 salınımını indükleyen IFN- γ , bakterinin veya enfekte eritrositlerin opsonizasyonunu sağlamakta ve hücre içi bakterilerin elimine edilmesinde rol oynayan makrofaj, sitokin ve nitrik oksit üretimini aktive etmektedir (52, 73-76). Yapılan çalışmalarda, *A. marginale* MSP2 ve MSP1a proteinleri ile immunize edilen sığırlarda güçlü bir antijen spesifik CD4+ T lenfosit proliferasyonu ve IFN- γ sekresyonu geliştiği ve daha sonra enfeksiyonu takiben antijen spesifik CD4+ T hücre yanıtında hızlı bir düşüş olduğu rapor edilmiştir. MSP1a'ya karşı gelişen spesifik yanıtındaki düşüşün, major histocompatibility complex (MHC) class II tetramerleri ile gözlemlenen periferik kandaki antijen spesifik CD4+ T hücre yanıtının fiziksel kaybından kaynaklandığı bildirilmiştir. Buna ilaveten MSP2'ye karşı gelişen yanıt persistent enfeksiyon süresince yaklaşık 1 yıl tespit edilememektedir. Yüksek düzeydeki bakteriyemilerde, immunizasyonda sadece OMP'lere karşı şekillenen CD4+ T hücre yanıtının rol almadığı bunun yanında bakteriyel antijenlerin de rol aldığı iddia edilmektedir (52, 73-76).

2.10. Tedavi

Anaplasmosis'in tedavisinde en etkili ve en sık kullanılan ilaçlar tetracycline, gloxazone ve imidocarb'dır. Enfeksiyonun erken safhalarında yapılan tedavi daha başarılı sonuçlar doğurmaktadır. Anaplasmosis'in tedavisinde kullanılan preparatlar ile tedavi şekli ve dozları Tablo 2.1'de gösterilmiştir (52, 84).

Tablo 2.1. Sığırlarda anaplasmosis'in tedavisinde kullanılan preparatlar

Sıra No	Uygulama amacı	Uygulama Şekli	Etken Madde Adı	Uygulama dozu (mg/Ib.B W)	Kullanım sıklığı
1		Oral	Chlortetracycline	0,5	Vektör sezonu boyunca günlük
2	Koruyucu	IV veya IM	Oxytetracycline (50-100 mg/ml)	3,0-5,0	Vektör sezonu boyunca 28 günde bir
3		IM	Oxytetracycline (LA 200)	9,0	Vektör sezonu boyunca 28 günde bir
4		Oral	Chlortetracycline	0,5	120 gün boyunca her gün
5		Oral	Chlortetracycline	5,0	60 gün boyunca her gün
6	Taşıyıcı eliminasyonu	IV veya IM	Oxytetracycline (50-100 mg/ml)	5,0	10 gün boyunca her gün
7		IV veya IM	Oxytetracycline (50-100 mg/ml)	10,0	5 gün boyunca her gün
8		IM	Oxytetracycline (LA 200)	9,0	3 gün aralıklarla 4 kez
9	Hasta hayvanların tedavisi	IM	Oxytetracycline (50-100 mg/ml)	5,0	Tek uygulama
10		IM	Oxytetracycline (LA 200)	9,0	Tek uygulama

*IM: Intramuscular, IV: Intravenöz

2.11. Korunma ve Kontrol

Anaplasmosis'te koruyucu önlemler arasında aynen babesiosis ve theileriosis'te olduğu gibi vektör kenelerle mücadele ve aşılamanın yanında bazı kan emici sineklerin mekanik olarak hastalık etkenlerini nakletmelerinin önüne geçilmesi amacıyla mekanik önlemlerin alınması gelmektedir. Bu amaçla kene mücadelesi çeşitli akarisitlerle yapılabileceği gibi virus, bakteri, protozoon, nematod, mantar gibi çeşitli biyolojik ajanlar ve kene aşılılarıyla da yapılmaktadır (35). Anaplasmosis'ten korunma ve kontrolde bir diğer yöntem de aşılamadır. Dünya'da bu hastalığa karşı en sık kullanılan yöntemlerden birisi de aşılama olup aşılar canlı

veya ölü aşı şeklinde kullanılmaktadır. En sık tercih edilen aşı canlı aşılardır olup içerisinde attenüe edilmiş veya çok az miktarda etken bulunmaktadır. Anaplasmosis'e karşı korunmada bir diğer yöntem de kan emici sineklere karşı ahırlara sinek tuzaklarının yerleştirilmesi, pencerelerin tel kafeslerle çevrelenmesi gibi mekanik önlemlerin alınmasıdır (54, 85).

2.12. Ekonomik Önemi

Sığır anaplasmosis'i birçok ülkede yüksek morbidite ve mortaliteye bağlı olarak önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu hastalığa bağlı ekonomik kayıplar, yalnızca ölümlere bağlı olmamakla birlikte yanında yavru atımı, et ve süt kaybı gibi verim kayıplarına ilaveten kontrol giderleri (ilaçlama, aşılama, tedavi vb.) de ekonomik kayıpları artırmaktadır. Sığırlarda anaplasmosis'e bağlı ekonomik kayıpların Amerika Birleşik Devletleri'nde 300 milyon doların üzerinde olduğu tahmin edilmektedir. Aynı şekilde Latin Amerika ülkelerinde ise bu oranın yaklaşık 800 milyon dolar olduğu bildirilmektedir (73).

2.13. Zoonotik Önemi

Sığırlarda anaplasmosis'e yol açan *A. phagocytophilum* insanlarda da hastalığa yol açabilmektedir. Bu *Anaplasma* türü insanlarda granulositik ehrlichiosis etkenidir. İnsanlara hastalık, vektör keneler vasıtasıyla bulaşmaktadır (1, 2).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Sahası ve Kene Örneklerinin Toplanması

Çalışmada, Kayseri yöresinin Yeşilhisar, Sarız ve Bünyan ilçelerindeki (Şekil 3.1) sığırlardan Nisan-Eylül 2015 tarihleri arasında toplam 265 ergin ixodid kene örnekleme yapılmıştır.



Şekil 3.1. Araştırma sahası

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1. Kene Örneklerinin Tür Teşhisleri

Kenelerin morfolojik identifikasyonları stereo mikroskop altında ilgili teşhis anahtarına (86) göre gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. DNA Ekstraksiyonu ve Konsantrasyonların Belirlenmesi

İdentifiye edilen kene örneklerinden bireysel olarak genomik DNA'ların elde edilmesi amacıyla AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kiti (AP-MN-MS-GDNA-250, Axygen Biosciences, USA) üreticinin açıklamalarına göre kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktlar moleküler analizlere kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Genomik DNA ekstraksiyonunun basamakları aşağıda verilmiştir.

- a) Her bir kene örneği, ayrı olarak mikrosantrifüj tüplerine alınarak sıvı azot yardımıyla ezilmiş ve homojen hale getirilmiştir. İşlenecek numune sayısına göre, örneklerin karışmaması amacıyla ependorf tüplerinin üzerine örnekler için ait protokol numaraları yazılmıştır. Kit içerisinde bulunan Eluent, önceden ısı 65°C'ye ayarlanmış su banyosu içerisine konulmuştur.
- b) Çözünmüş pellet üzerine 350 µl PBS (phosphate-buffered saline) ve 0,9 µl RNase A ilave edilmiş ve 30 sn el yardımıyla nazikçe çalkalanmıştır.
- 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 1 dk vortekslenmiştir.
- e) Tüpler 56°C'de 15 dk su banyosunda inkübe edilmiştir (Her 2-5 dk'da bir vortekslenmiştir).
- 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 etanolün tamamen uçması sağlanmıştır.

l) Her bir örneğe ait miniprep columnlar 1,5 ml'lik yeni ependorf tüplerine yerleştirilmiştir. Üzerlerine, önceden 65°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 edilmiştir. Elde edilen DNA'lar analize tabi tutulana kadar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edilmiştir.

Bireysel olarak elde edilen genomik DNA ekstraktlarının konsantrasyonları ASP-3700 (ACT Gene) nanodrop spektrofotometrede belirlenmiştir. PCR aşamasından önce saptanan genomik DNA konsantrasyonlarına göre örnekler için en uygun sulandırma hazırlanmıştır. Elde edilen DNA'lar kullanılabilecek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Real Time PCR Analizleri

Kene örneklerinden bireysel olarak elde edilen genomik DNA'larda *A. phagocytophilum* için *msp-2* gen bölgesini hedef alan TaqMan prob bazlı Real Time PCR kullanılarak araştırılmıştır. *Msp-2* geninin amplifikasyonu amacıyla ApMSP2 F (5'-ATGGAAGGTAGTGTGGTTATGGTATT-3') ve ApMSP2r (5'-TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA-3') primerleri, prob olarak ApMSP2 P HEX (5'-TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG-3') kullanılmıştır (87). Her bir reaksiyon 50ng template DNA, 2XTaqMan qPCR master miks, 20µM ApMSP2 F ve ApMSP2r primerleri, 5µM ApMSP2 P prob içerecek şekilde steril PCR grade deiyonize su ile total hacim 25µl'ye tamamlanmıştır. Her bir örnek ikili olarak çalışılmıştır.

Real Time PCR analizleri Stratagene Mx 3005P (Stratagene, Agilent Technologies, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan termal profil aşağıda gösterilmiştir (87).

- | | | |
|------|------------|-------------|
| I. | 95 °C 10dk | 1 siklus |
| II. | 95 °C 15s | } 40 siklus |
| III. | 60 °C 60s | |

Msp-2 genini hedef alan TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizlerinin geçerliliği

açısından her reaksiyonda pozitif kontrol olarak daha önce Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia Enstitüsü/Palermo, İtalya'dan (Dr. Alessandra Torina) temin edilmiş genomik DNA, negatif kontrol olarak ise steril deiyonize su kullanılmıştır.

3.2.4. DNA Amplifikasyonu ve Elektroforez

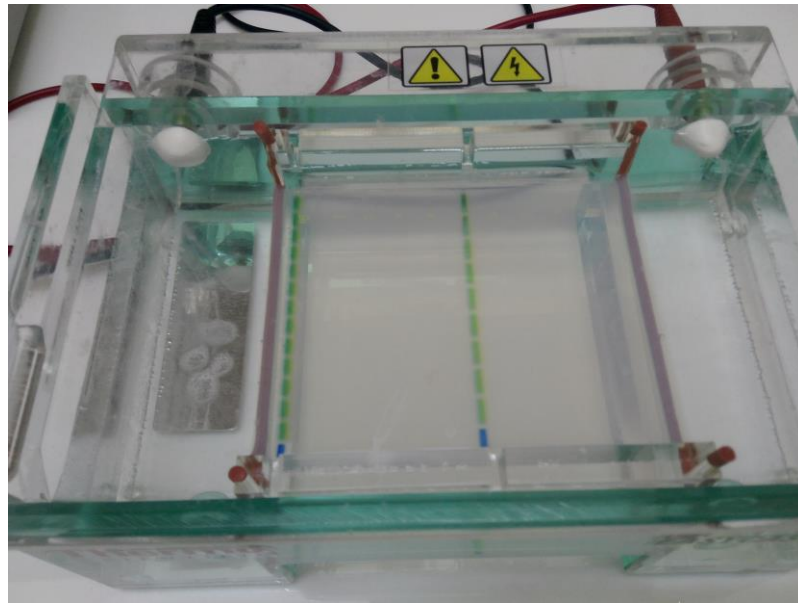
Elde edilen genomik DNA ekstraktları *A. phagocytophilum* 16S rRNA gen bölgesinden yaklaşık 641 bp'lik gen bölgesini amplifiye eden primerler (Tablo 3.1) kullanılarak nested PCR reaksiyonuna tabii tutulmuştur.

Tablo 3.1. *Anaplasma phagocytophilum*'un 16S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler

	Primer Adı	Dizilim (5'---3')	Band profili (bp)	Kaynak
1. PCR	EC9	TACCTTGTTACGACTT	1462	88
	EC12A	TGATCCTGGCTCAGAACGAACG		
Nested	SSAP2f	GCTGAATGTGGGGATAATTTAT	641	
PCR	SSAP2r	ATGGCTGCTTCCTTTTCGGTTA		

Reaksiyon karışımı her iki PCR aşamasında da 25 µl final konsantrasyonda, 2,5 µl 10XPCR buffer, 2 mM MgCl₂, 1 µM her bir primer, 0,5 mM her bir dNTP, 1,25U Taq DNA polymerase ve 50ng/µl template DNA olarak hazırlanmıştır. Thermal cyclerde protokol birinci PCR için initial denaturation: 94°C'de 5 dk; 40 siklus, denaturation: 94°C'de 30 sn, annealing: 52°C'de 30 sn, extension: 72°C'de 1dk ve nested PCR için initial denaturation: 94°C'de 5 dk; 40 siklus, denaturation: 94°C'de 60 sn, annealing: 55°C'de 60 sn, extension: 72°C'de 1dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak standardize edilmiş referans örneklerle ait genomik DNA'lar, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla yatay elektroforez tankı (CLP) kullanılmıştır. Toplam hacim 1 lt olacak şekilde; 980 ml deiyonize su üzerine 20 ml 50XTAE (Tris-acetate-EDTA) buffer eklenerek elde edilen solusyon, hem jel hazırlanmasında hem de elektroforez tankının içerisinde 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 içerisinde 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 (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Elektroforez tankına amplikonların yüklenmesi (Orijinal)

Yüklenen örnekler; sabit akımda, 90 V'da 50 dakika süreyle yürütülmüştür. Süre sonunda örnekler jel dokümantasyon sistemi (Gen Genuis) ile UV ışın altında görüntülenmiştir.

3.2.5. Jelden Ekstraksiyon İşlemi

Anaplasma phagocytophilum pozitif izolatların 16S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerle yapılan nested PCR sonucu ürünler %1,5'lik agarozda yürütülmüştür. Ürünler UV ışın altında jel dokümantasyon sistemi ile görüntülenmiş ve 641 bp'lik bantlar ticari

High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)'inin önerileri doğrultusunda jelden ekstrakte edilme aşamasına gelinmiştir. Jelden ekstraksiyon işlemi ticari kitin önerileri doğrultusunda şu şekilde yapılmıştır:

1. 641 bp büyüklüğündeki bant jelden steril bir bistüri ucu yardımıyla kesilerek 1,5 ml'lik DNA'se RNA'se free bir tüp içerisine yerleştirmeden önce hassas terazide tüp boşken darası alındı.
2. Daha sonra kesilen jel parçası tüp içerisinde iken tekrar tartıldı ve böylelikle jelin ağırlığı hesaplanmış oldu.
3. Jel parçasının ağırlığına göre 100 mg ağırlığındaki jel parçası için 300 µl binding buffer olacak şekilde solusyon jel parçasının üzerine eklendi.
4. Ependorf tüpü 30 saniye vortekslendi.
5. Önceden 56 °C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde tüp 10 dakika inkubasyona bırakıldı. Her 2 dakikada bir ependorf tüpü vortekslendi.
6. Tüp içerisindeki agaroz jel parçası tamamen çözündükten sonra 100 mg ağırlığındaki jel parçası için 150 µl isopropanol olacak şekilde solusyon ilave edilerek tüp iyice vortekslendi.
7. Ticari kitin içeriğinde bulunan toplama tüpleri içerisine high pure filter tüpleri yerleştirildi. Ependorf tüpünün içerisindeki bütün sıvı pipet yardımıyla tamamen bu filtreli tüpün içerisine boşaltıldı.
8. Sıvıyı içeren tüp oda ısısında 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Alttaki toplama tüpüne süzülen sıvı boşaltıldı ve üstteki filtreli tüp tekrar aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
10. Özel filtresi sayesinde DNA'yı içine hapseden filtreli tüpün içerisine DNA'yı yıkama amacıyla 500 µl Wash buffer ilave edilerek 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Santrifügasyondan sonra alta süzülen sıvı uzaklaştırıldı ve filtreli tüp aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
12. İkinci yıkama amacıyla üzerine tekrar 200 µl Wash buffer ilave edilerek 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. İkinci yıkama ile sekanslamada

muhtemelen problem teşkil edebilecek tuz ve enzim gibi maddeler uzaklaştırılmış oldu.

13. Alta süzülen sıvı tekrar uzaklaştırıldı. Filtreli tüp bu kez, yeni 1,5 ml'lik DNA'se RNA'se free bir tüp içerisine yerleştirildi.
14. Filtrede hapsolan DNA'yı alttaki ependorfa süzmek amacıyla 50 µl Elution buffer ilave edildi. 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek 1,5 ml'lik steril tüp içerisine süzülen sıvı DNA'yı ihtiva eden PCR ürünü olarak, sekanslamaya gönderilinceye kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.6. 16S rRNA Geninin Klonlanması ve Plasmid İzolasyonu

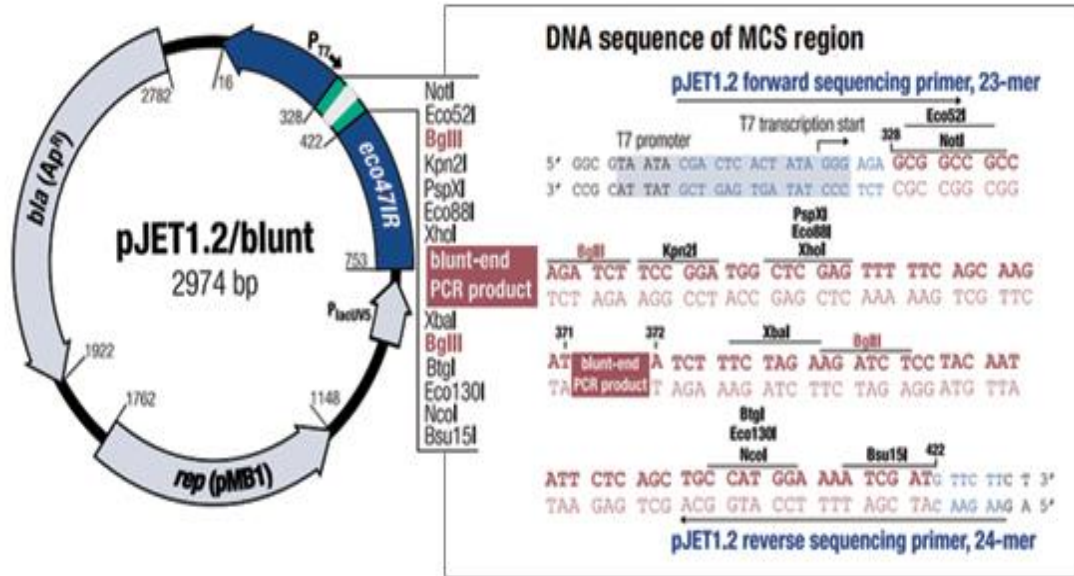
Kene örneklerinde PCR ile pozitif belirlenen iki *A. phagocytophilum* izolatu klonlanmış ve plasmid pürifikasyonu yapılmıştır. Klonlama basamakları aşağıda verilmiştir.

3.2.6.1. Ligasyon basamağı: 16S rRNA gen bölgesi yönünden PCR analizleri sonucu jel üzerinde belirlenen ampikonlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Jel pürifiye örneklerin klonlanmasında CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Klonlama reaksiyonu kullanıcının önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanmış ve yapılmıştır:

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

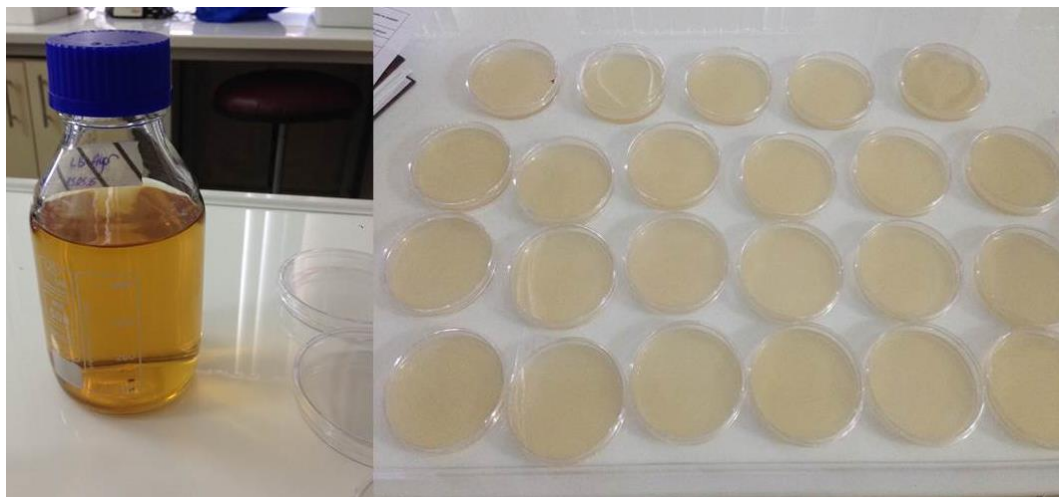
Hazırlanan karışım vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70 °C'de su banyosunda 5 dk inkübe edilerek hemen buz üstüne alınmıştır.

Karışım üzerine daha sonra 1 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 klonlama vektör haritası Şekil 3.3'de verilmiştir.



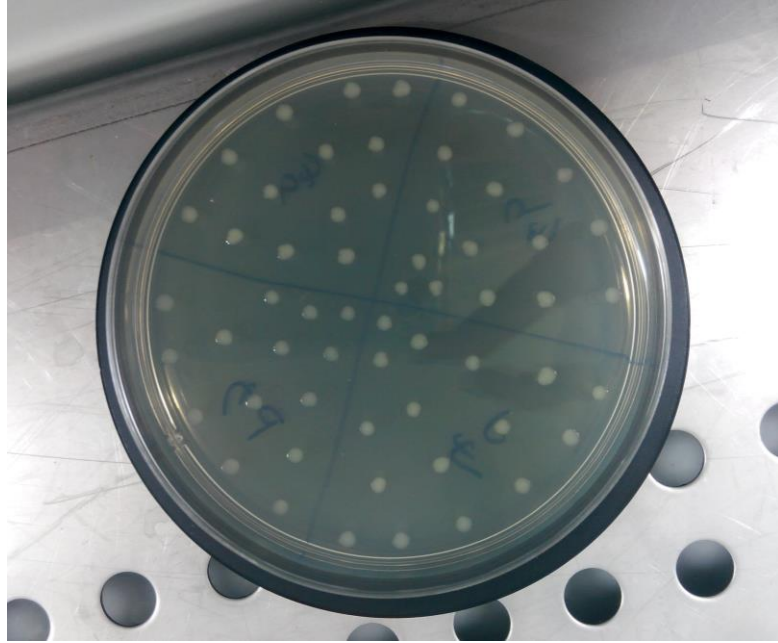
Şekil 3.3. pJET1.2/blunt klonlama vektörü

3.2.6.2. 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°C'de 1 dk daha sonra buz üzerinde 2 dk bekletildikten sonra üzerine 250 µL SOC Medium eklenmiştir. 37°C'de çalkalayıcı üzerinde 1,5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı LB (Lurie-Bertani) katı besiyerine (Şekil 3.4) ekilerek bir gece inkübe edilmiştir.



Şekil 3.4. LB katı besiyeri hazırlanma prosedürü (Orijinal)

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerden (Şekil 3.5) steril pipet uçları ile alınarak yeniden LB katı besiyerine ekilmiş ve 37°C'de 1 gece daha inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.5. LB katı besi yerinde üreyen koloniler (Orijinal)

3.2.6.3. Koloni Screening PCR: LB katı besi yerinde üreyen kolonilerin rekombinant plasmidi içerip içermediğini anlamak için koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR için 10 μ l ITaq master mix'i, 0,4 μ l 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 μ L'lik karışımlar hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 95 °C'de 3 dk; 25 siklus, denaturation: 94 °C'de 30 s, annealing: 60 °C'de 30 s, extension: 72 °C'de 1 dk; final extension: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR sonucu elde edilen amplikonlar %1,5'luk agaroz jelde yürütölüp görüntülenmiştir.

3.2.6.4. Plasmid DNA: Pozitif bulunan kolonilerden plasmid DNA'sı elde etmek için LB katı besi yerinden steril özeler ile alınan koloniler ampisilinli 5 ml'lik LB sıvı besi yerlerine ekimi yapılarak (Şekil 3.6) 37°C'de sallayıcı üzerinde bir gece inkübe edilmiştir. Üreme gözlenen sıvı besi yerlerinden alınan örnekler 2 mL'lik ependorflar içerisine alınarak 6000g'de 15 dk santrifüj edilip, santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım dökülerek pelet daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.6. LB katı besi yerinden alınan kolonilerin ampisilinli LB sıvı besi yerlerine ekimi ve 37°C’de sallayıcı üzerinde inkubasyonu (Orijinal)

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 °C’de saklanan peletin oda sıcaklığında çözünmesi sağlandıktan sonra üzerine 250 µl Buffer S1 eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- 2- Üzerine 250 µl Buffer S2 eklenmiş ve el ile 6 kez hafifçe çalkalanmıştır.
- 3- Daha sonra üzerine 350 µl Buffer S3 eklenmiş ve yine el yardımı ile hafifçe 8 kez çalkalanmıştır.
- 4- Karışım daha sonra 12,000×g’de 10 dakika santrifüj 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 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.7. Klonlanan 16S rRNA Geninin Tür Tayini için Sekans ve Filogenetik Analizleri

16S rRNA gen bölgesi için elde edilmiş olan plasmid DNA'lar pJET1.2 forward ve reverse primerleriyle çift yönlü olarak MacroGen firmasına sekanslatırılmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plasmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 5.5.5 (89) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin pairwise alignmentları yapılarak vektör DNA'sı ile kıyaslanmış, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlenmiş ve izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri ve Geneious 6.1.6 (89) genetik analiz yazılımıyla çoklu hizalamaları yapılarak konak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur. Bu amaçla DNA veri matrisi oluşturulmuştur. Maximum likelihood ağacı oluşturulurken kimura 2 parameter baz değişim modeli kullanılmıştır. Baz değişim modeli ile 1000 tekrardan oluşan bootstrap analizi yapılmıştır. İzolatlar arasındaki pairwise analizleri (uzaklık indeksleri) K2P modeli ile hesaplanmıştır. Filogenetik analizler Mega 6 (90) programıyla yapılmıştır. Elde edilen nükleotid dizilerinin GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. İdentifiye Edilen Kene Türleri

Çalışmada, sığırlardan toplanan 265 ergin ixodid kene örneği; 60 *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus*, 21 *Haemaphysalis* *parva*, 53 *Hyalomma* *marginatum*, 32 *H. anatolicum*, 36 *H. excavatum*, 30 *H. detritum*, 25 *Rh. turanicus* ve 8 *Rh. bursa* olarak identifiye edilmiştir (Şekil 4.1-4.8).



Şekil 4.1. Ergin dişi *Hyalomma detritum*



Şekil 4.2. Ergin erkek ve dişi *Hyalomma marginatum*



Şekil 4.3. Ergin erkek ve dişi *Hyalomma anatolicum*



Şekil 4.4. Ergin erkek ve dişi *Hyalomma excavatum*



Şekil 4.5. Ergin erkek ve dişi *Haemaphysalis parva*



Şekil 4.6. Ergin erkek ve dişi *Rhipicephalus (Rhipicephalus) turanicus*



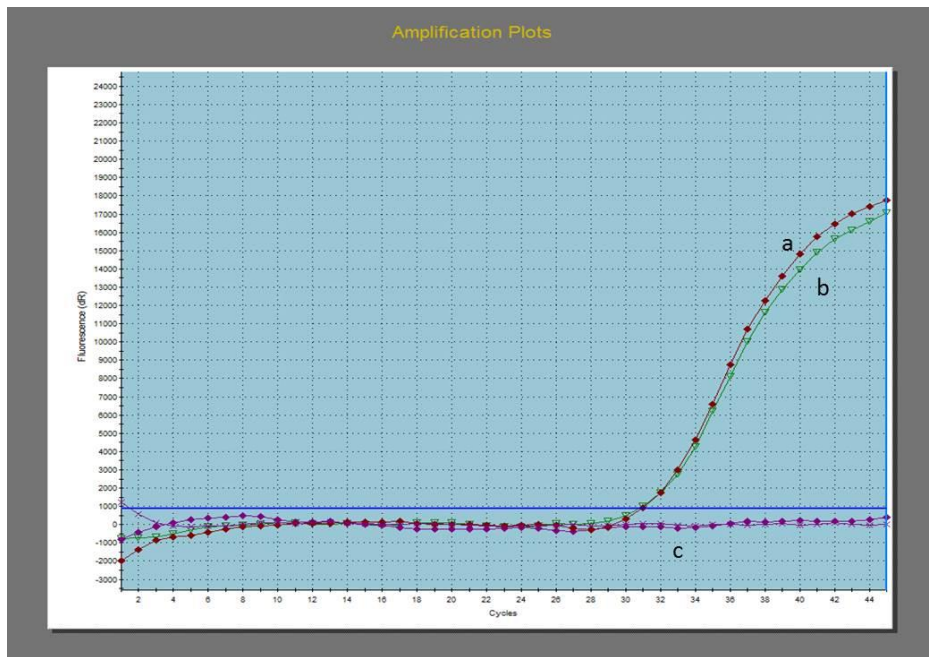
Şekil 4.7. Ergin erkek ve dişi *Rhipicephalus (Rhipicephalus) bursa*



Şekil 4.8. Ergin erkek ve dişi *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*

4.2. Real Time PCR Sonuçları

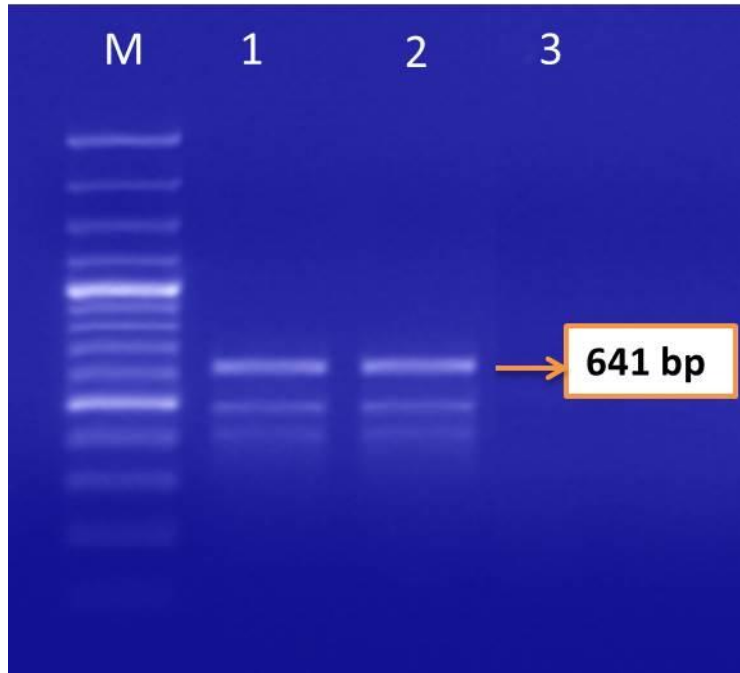
TaqMan prob tabanlı Real Time PCR sonuçlarına göre incelemesi yapılan 265 ergin ixodid kene DNA'sının 2'sinde (%0,75) pozitiflik belirlenmiştir. Pozitif belirlenen örneklerin biri *Rh. turanicus* diğeri de *H. marginatum* türlerinde saptanmıştır. Her iki pozitif izolat için belirlenen Ct (dR) (Eşik değer siklusu) değerleri ortalama 31,86 olarak belirlenmiştir. TaqMan prob tabanlı Real Time PCR'da *A. phagocytophilum* için *msp-2* gen bölgesini amplifiye eden spesifik primer ve problarla örneklerin analiz sonuçları Şekil 4.9'de verilmiştir.



Şekil 4.9. Sığırlardan toplanmış kene DNA'larında *A. phagocytophilum* yönünden TaqMan prob bazlı Real Time PCR analiz sonuçları, a, b: Pozitif örnekler, c: Negatif örnekler

4.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyon Sonuçları

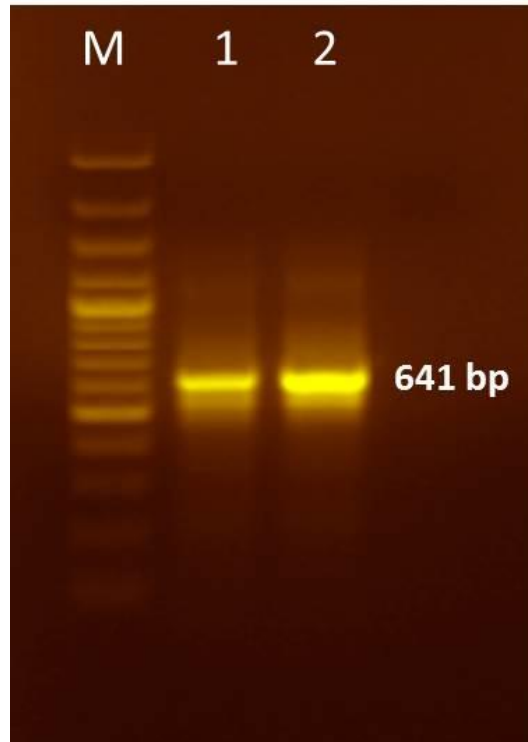
Bireysel olarak incelemesi yapılan ve *A. phagocytophilum* pozitif belirlenen *Rh. turanicus* ve *H. marginatum* izolatlarının 16S rRNA gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerle nested PCR analizleri sonucu jel üzerinde yaklaşık 641 bp büyüklüğünde amplifikasyon gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu örneklerde parsiyel 16S rRNA gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonların %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. *Anaplasma phagocytophilum* izolatlarının parsiyel 16S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 1, 2: Pozitif örnekler; 3: No DNA

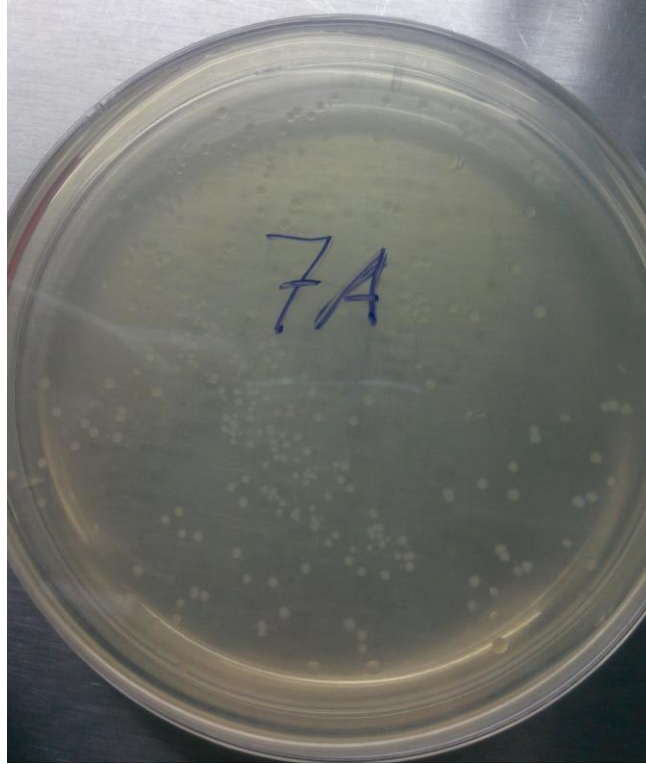
4.4. 16S rRNA Gen Bölgesinin Klonlama Sonuçları

Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış ixodid kenelerden elde edilen iki *A. phagocytophilum* izolatı 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 (Şekil 4.11).



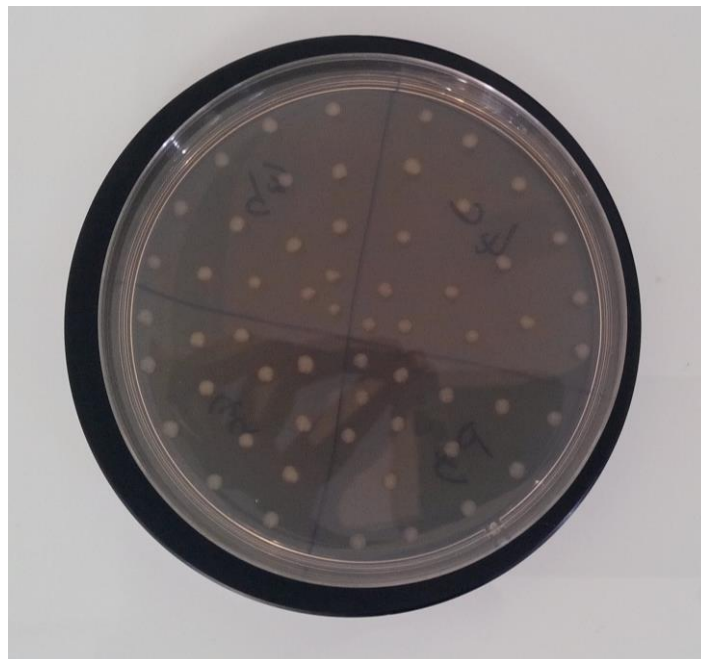
Şekil 4.11. *Anaplasma phagocytophilum* izolatlarının jel pürifikasyonu sonrası ampikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 1: TRAphagHmar izolatı; 2: TRAphagRtur izolatı

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 edilmiştir. Bir gece inkubasyon sonrası ampicylin LB besi yerinde oluşan koloniler Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



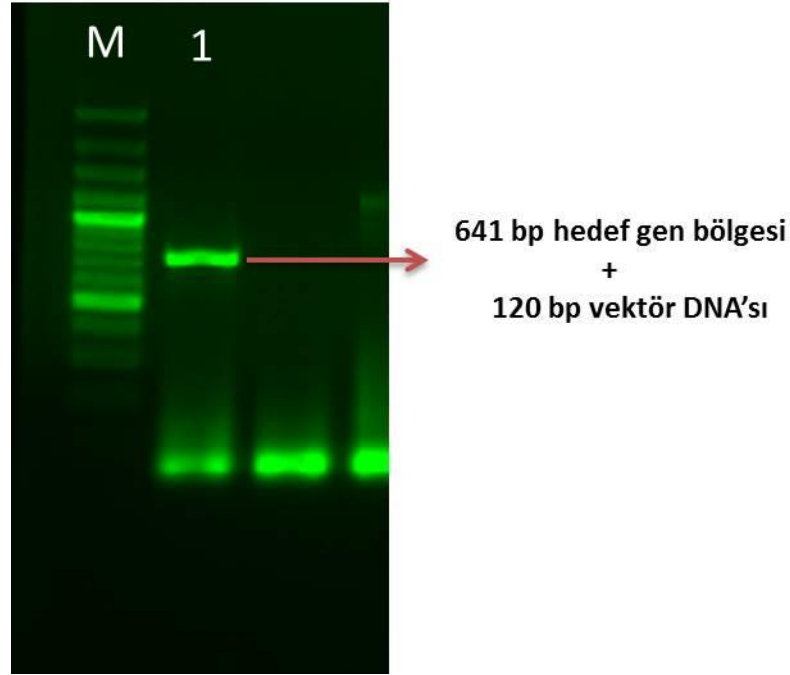
Şekil 4.12. Transformasyon sonucu besi yerinde oluşan koloniler (Orijinal)

LB katı besi yerinde üreyen kolonilerden seçilen tek koloniler, transformasyon etkinliğini artırmak amacıyla steril pipet uçları ile alınıp ayrı ayrı tekrar LB katı besi yerine ekilmiştir. Tekrar 37 °C'de 1 gece inkübe edilen kolonilerin katı besi yerinde görünüşleri Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.13. Transformasyon basamağında 2. inkübasyon basamağı sonucu oluşan koloniler (Orijinal)

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerde hedef gen bölgesinin vektöre insert olduğu ve transformasyon etkinliği vektör spesifik primerlerle koloni PCR yapılarak teyit edilmiştir. 16S rRNA gen bölgesinin koloni PCR sonuçları Şekil 4.14’de gösterilmiş olup 16S rRNA gen bölgesine ait DNA’ların vektörlere başarılı bir şekilde insert olduğu görülmüştür.



Şekil 4.14. Transforme hücrelerde 16S rRNA gen bölgesinin koloni PCR’ı sonucu ampliconların jel agarozda görünümü. M: Marker (100bp); 1: İnsert 16S rRNA gen bölgesi

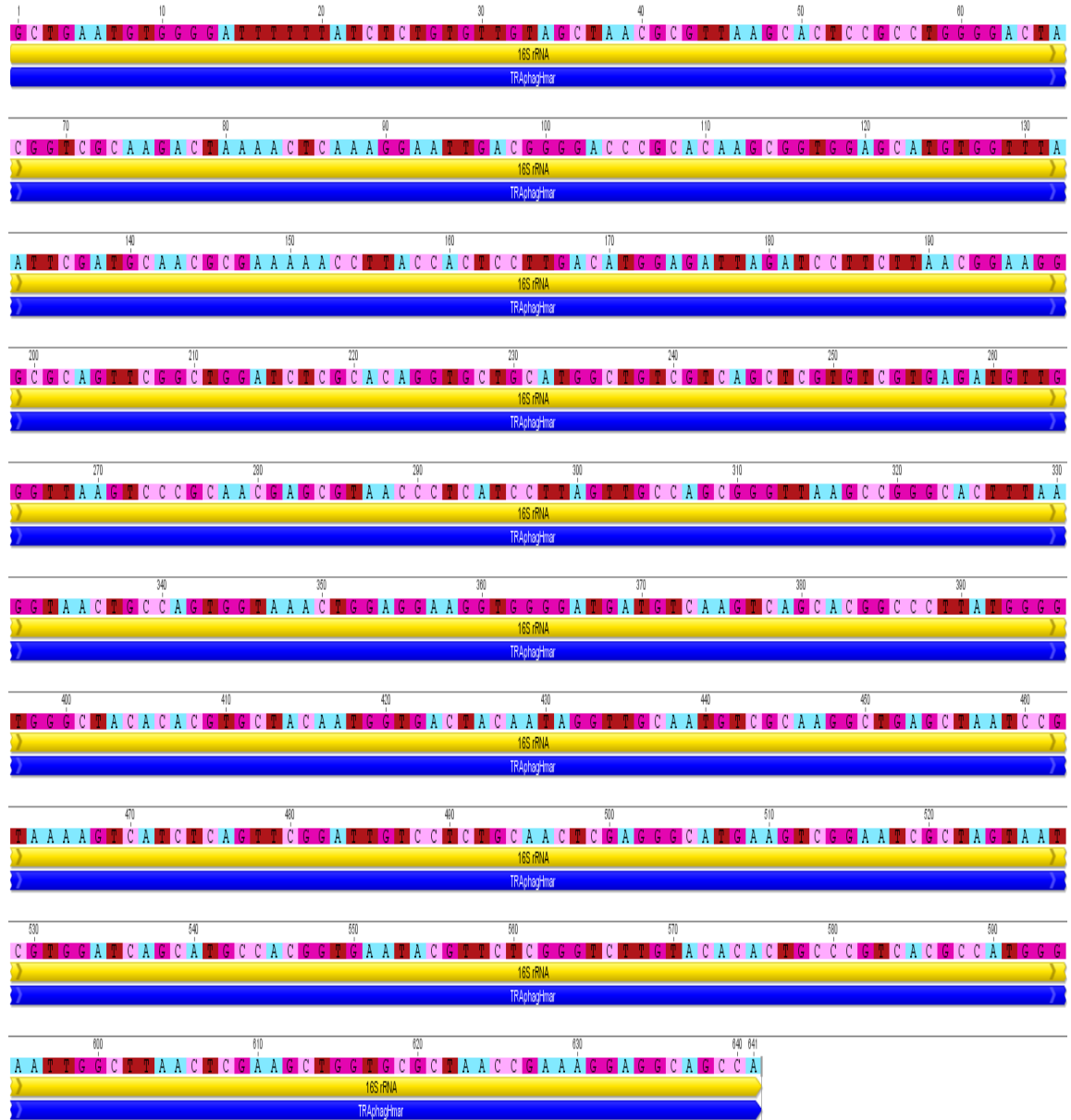
Koloni PCR sonuçlarını takiben ilgili gen bölgeleri yönünden pozitif saptanan tek bir koloni seçilerek sıvı besiyerine aktarılmış, bir gece 37°C’de inkubasyondan sonra üreyen transforme hücreler santrifüj ile çöktürülmüştür. Daha sonra transforme hücrelerden plasmid pürifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.4. 16S rRNA Geninin Sekans ve Filogenetik Analizleri

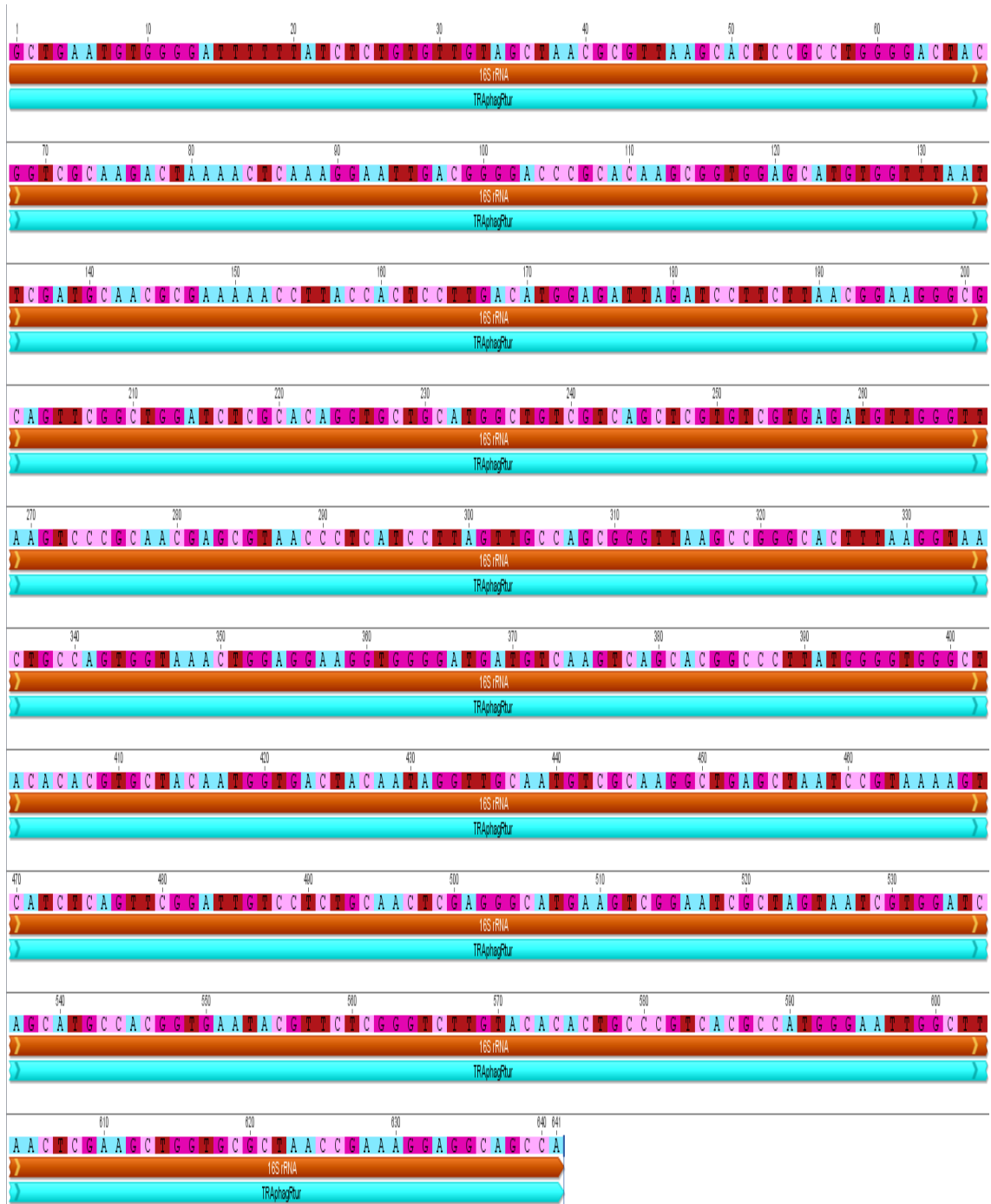
16S rRNA gen bölgesi yönünden elde edilen plasmidler, vektör spesifik primer çifti ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Elde edilen nükleotid dizileri vektör sekansı ile alignment yapılarak ilgili gen bölgesinin sekansları elde edilmiştir. 16S rRNA gen bölgesi yönünden sekansları belirlenen *A. phagocytophilum* izolatlarının, izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.1’de, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.15-4.16’da verilmiştir.

Tablo 4.1. Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış kene örneklerinde belirlenen *A. phagocytophilum* izolatlarının gen bölgesi, izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları

İzolat	Gen bölgesi	İzolasyon Kaynağı	GenBank Aksesyon Numarası
TRAphagHmar	16S rRNA	Ergin <i>Hyalomma marginatum</i>	KU925346
TRAphagRtur	16S rRNA	Ergin <i>Rhipicephalus turanicus</i>	KU925347



Şekil 4.15. TRAphagHmar izolatının parsiyel 16S rRNA gen bölgesi nükleotit ve aminoasit dizilimleri (KU925346)



Şekil 4.16. TRApHagRtur izolatının parsiyel 16S rRNA gen bölgesi nükleotid ve aminoasit dizilimleri (KU925347)

Kayseri yöresindeki sığırlardan elde edilen *A. phagocytophilum* TRApHagHmar ve TRApHagRtur izolatlarıyla 16S rRNA gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan GenBank veri tabanında kayıtlı Dünya'daki ve Türkiye'deki diğer bazı *A. phagocytophilum* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Dünyadan ve Türkiye’den filogenetik kıyaslaması yapılan diğer bazı *A. phagocytophilum* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	Orijin	İzolasyon kaynağı	Gen Bölgesi	Aksesyon Numarası
ES34	A.B.D.	Yabani geyikler ve keneler	16S rRNA	AB196720
SS33P-L	A.B.D.	Yabani geyikler ve keneler	16S rRNA	AB196721
IR12Chi	Moldova	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	AB287396
9-08	Türkiye	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	AB604782
73-08	Türkiye	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	AB604783
208-08	Türkiye	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	AB604784
-	Polonya	Köpek	16S rRNA	DQ105667
E	Almanya	<i>Canis familiaris</i> (Golden Retriever)	16S rRNA	EF068227
Kh-Ip80	Rusya	<i>Ixodes persulcatus</i>	16S rRNA	HM366588
EKY155	Türkiye	Keçi	16S rRNA	JF807994
EKY144	Türkiye	Koyun	16S rRNA	JF807995
10100	Türkiye	Köpek	16S rRNA	JN656375
TR83Z3	Almanya	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	JX627377
TR68Z3	Almanya	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	JX627378
6EGIII70	Almanya	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	JX909354
125NA133	Almanya	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	JX909355
4NA115	Almanya	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	JX909360
Omsk-vole121	Rusya	<i>Myodes rutilus</i>	16S rRNA	KC583436
1-2a	Çin	Güvercin	16S rRNA	KC916730
3-40a	Çin	Baykuş	16S rRNA	KC916731
H116	Türkiye	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	16S rRNA	KF034787
IM160	Almanya	<i>Erinaceus europaeus</i>	16S rRNA	KF242586
C139	Türkiye	Koyun ve keçi	16S rRNA	KF459965
77HNIRQ	Slovakya	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	KF481933
UK_40	Türkiye	Koyun	16S rRNA	KJ183079
HS56	Türkiye	Kene	16S rRNA	KJ195692
DM14Z1	Almanya	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	KJ769156
EU343	Slovenya	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	KM215229
EU108	Slovenya	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	KM215234
ApGGo4	Tunus	Keçi	16S rRNA	KM285229
ApGOv1	Tunus	Koyun	16S rRNA	KM285230
IR-370.9	Polonya	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	KP245906
IR-402.8	Polonya	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	KP245907
IR-472.1	Polonya	<i>Ixodes ricinus</i>	16S rRNA	KP245908
Trbrt45	Türkiye	Sığır	16S rRNA	KP745629
N20	Norveç	<i>Alces alces</i>	16S rRNA	KT070825

İliCXX	Çin	Sığır	16S rRNA	KT944028
İliSXX	Çin	Koyun	16S rRNA	KT944029
İliTX	Çin	Kene	16S rRNA	KT951192

Hyalomma marginatum ve *Rhipicephalus turanicus* örneklerinde pozitif belirlenen ve nükleotid dizisi ortaya konan *A. phagocytophilum* izolatları ile Dünya'dan ve Türkiye'den çoklu hizalama analizlerine dahil edilen diğer izolatların 16S rRNA gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Tablo 4.3'de, ikili kıyaslamaları ise Şekil 4.17'de verilmiştir.

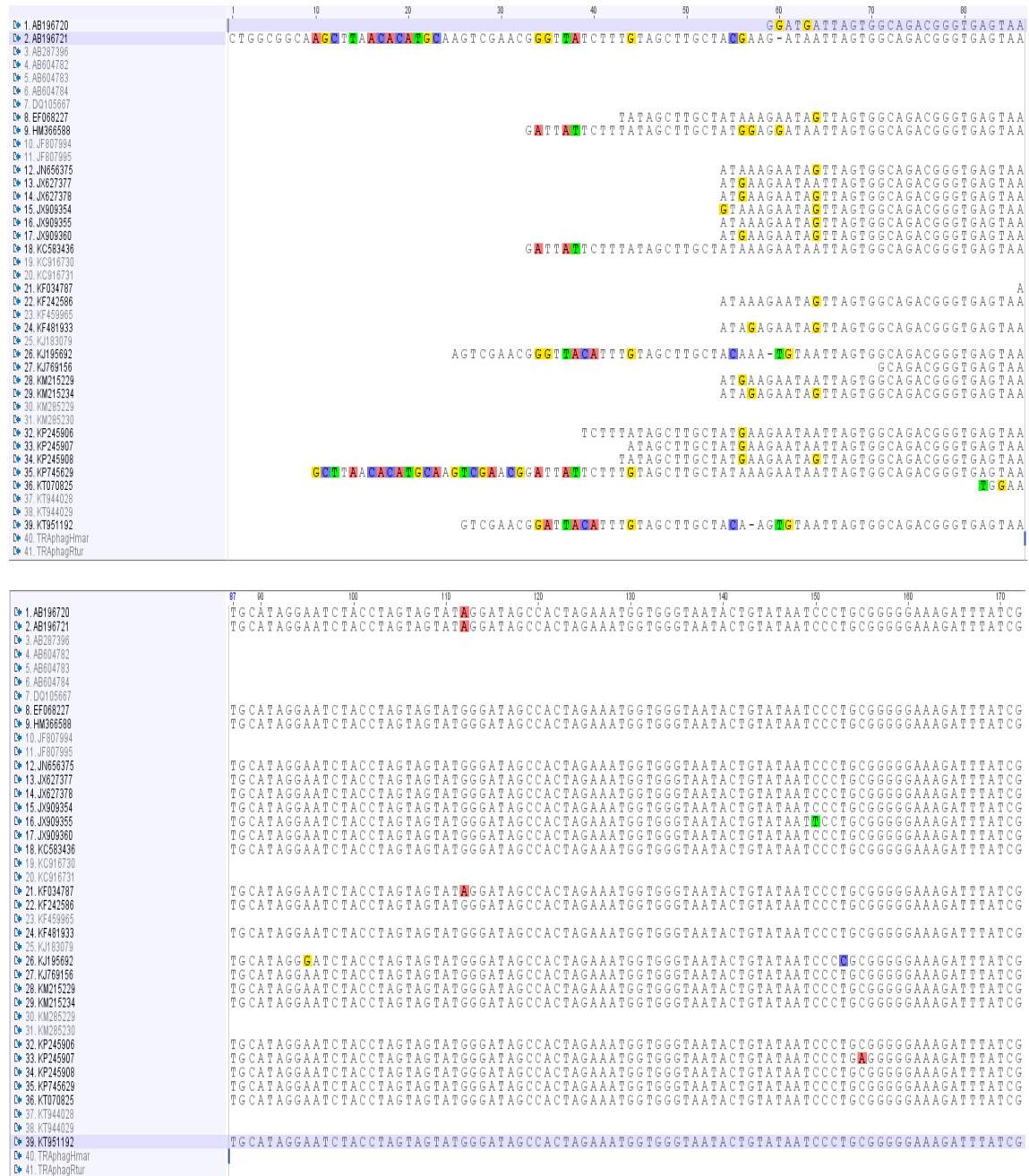
Tablo 4.3. Çoklu hizalamaları yapılan *A. phagocytophilum* pozitif izolatlar ve Dünyadan ve Türkiye'den diğer bazı *A. phagocytophilum* izolatlarının nükleotid kompozisyonları

İzolat	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)	Toplam nükleotid sayısı
ES34	22,3	20,8	26,2	30,6	48,6	51,4	1338,0
SS33P-L	22,5	21,0	26,3	30,3	48,7	51,3	1389,0
IR12Chi	23,6	17,9	26,4	32,1	50,0	50,0	246,0
9-08	22,5	21,1	25,0	31,4	47,5	52,5	592,0
73-08	22,5	21,1	24,8	31,6	47,3	52,7	592,0
208-08	22,5	21,0	24,7	31,7	47,3	52,7	590,0
- (Polonya)	20,6	19,5	26,5	33,4	47,1	52,9	344,0
E	22,8	17,8	28,4	31,0	51,2	48,8	461,0
Kh-Ip80	23,5	20,0	26,0	30,5	49,5	50,5	1295,0
EKY155	22,4	23,9	24,4	29,3	46,8	53,2	615,0
EKY144	22,4	23,9	24,4	29,3	46,8	53,2	615,0
10100	22,3	17,5	28,6	31,6	50,9	49,1	497,0
TR83Z3	22,3	17,5	28,6	31,6	50,9	49,1	497,0
TR68Z3	22,3	17,5	28,4	31,8	50,7	49,3	497,0
6EGIII70	22,3	17,5	28,6	31,6	50,9	49,1	497,0
125NA133	22,5	17,3	28,8	31,4	51,3	48,7	497,0
4NA115	22,3	17,5	28,4	31,8	50,7	49,3	497,0
Omsk-vole121	23,4	20,1	26,3	30,3	49,7	50,3	1295,0
1-2a	22,8	23,6	24,6	29,0	47,4	52,6	641,0
3-40a	22,8	23,6	24,6	29,0	47,4	52,6	641,0
H116	22,9	18,5	27,5	31,2	50,4	49,6	542,0
IM160	22,3	17,5	28,8	31,4	51,1	48,9	497,0
C139	22,3	23,7	25,0	28,9	47,4	52,6	591,0
77HNIRQ	22,3	17,5	28,4	31,8	50,7	49,3	497,0
UK_40	22,6	23,7	24,3	29,4	47,0	53,0	575,0
HS56	23,5	17,8	28,6	30,1	52,1	47,9	405,0
DM14Z1	22,4	18,2	27,9	31,5	50,3	49,7	499,0
EU343	22,6	18,9	27,7	30,8	50,3	49,7	869,0
EU108	22,6	18,9	27,6	31,0	50,2	49,8	869,0
ApGGo4	23,0	24,2	23,5	29,2	46,6	53,4	599,0

ApGOv1	22,7	24,2	23,7	29,3	46,5	53,5	598,0
IR-370.9	23,3	17,9	27,7	31,1	51,0	49,0	524,0
IR-402.8	22,6	17,5	28,4	31,5	51,0	49,0	514,0
IR-472.1	22,7	17,7	28,0	31,7	50,7	49,3	515,0
Trbrt45	23,2	20,4	26,1	30,3	49,4	50,6	1404,0
N20	23,0	18,3	27,5	31,2	50,5	49,5	487,0
IliCXX	23,5	22,9	24,1	29,4	47,7	52,3	642,0
IliSXX	22,7	23,5	24,9	28,8	47,7	52,3	642,0
IliTX	22,5	19,0	27,6	30,8	50,1	49,9	924,0
TRaphagHmar	23,6	23,2	24,0	29,2	47,6	52,4	641,0
TRaphagRtur	23,6	23,2	24,0	29,2	47,6	52,4	641,0
Ortalama	22,7	20,4	26,3	30,5	49,1	50,9	661,2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41		
1. AB196720 <i>A. phagocytophilum</i> ES34 USA		0.00	0.19	0.30	0.30	0.34	0.17	0.00	0.00	0.29	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27	0.27	0.01	0.00	0.29	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.32	0.00	0.32	0.32		
2. AB196721 <i>A. phagocytophilum</i> SS33P-L USA	0.00		0.19	0.30	0.30	0.34	0.17	0.00	0.00	0.29	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27	0.27	0.01	0.00	0.29	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.32	0.00	0.32	0.32		
3. AB287396 <i>A. phagocytophilum</i> TR12Chi Moldova (Tick)	1.08	1.08		0.38	0.38	0.25	0.00	0.19	0.19	0.35	0.35	0.19	0.19	0.19	0.21	0.21	0.19	0.19	0.35	0.35	0.21	0.21	0.35	0.19	0.35	0.19	0.19	0.19	0.19	0.35	0.40	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.38	0.36	0.19	0.36	0.36		
4. AB604782 <i>A. phagocytophilum</i> 9-08 Turkey (Tick)	1.30	1.30	1.42		0.00	0.02	0.34	0.30	0.30	0.01	0.01	0.30	0.30	0.33	0.33	0.30	0.30	0.01	0.01	0.30	0.33	0.01	0.30	0.01	0.35	0.30	0.30	0.30	0.01	0.01	0.30	0.30	0.30	0.30	0.01	0.01	0.30	0.30	0.01	0.01	0.30	0.01	
5. AB604783 <i>A. phagocytophilum</i> 73-08 Turkey (Tick)	1.30	1.30	1.42	0.00		0.02	0.34	0.30	0.30	0.00	0.00	0.30	0.30	0.33	0.33	0.30	0.30	0.01	0.01	0.30	0.33	0.00	0.30	0.00	0.35	0.30	0.30	0.30	0.00	0.01	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.01	0.01	0.30	0.00	0.00			
6. AB604784 <i>Anaplasma</i> sp. 208-08 Turkey (Tick)	1.34	1.34	1.28	0.06	0.05		0.23	0.34	0.34	0.02	0.02	0.34	0.34	0.34	0.39	0.39	0.34	0.34	0.02	0.02	0.34	0.39	0.02	0.34	0.02	0.39	0.34	0.34	0.34	0.02	0.02	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.02	0.02	0.34	0.02	0.02		
7. DQ105667 <i>A. phagocytophilum</i> Poland (Dog)	1.06	1.06	0.00	1.38	1.38	1.24		0.17	0.17	0.32	0.32	0.17	0.17	0.17	0.19	0.19	0.17	0.17	0.32	0.32	0.19	0.19	0.32	0.17	0.32	0.17	0.17	0.17	0.17	0.32	0.35	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.35	0.32	0.17	0.32	0.32		
8. EF068227 <i>A. phagocytophilum</i> E Germany (Dog)	0.00	0.00	1.08	1.30	1.30	1.34	1.06		0.00	0.29	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27	0.27	0.01	0.00	0.29	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.32	0.00	0.32	0.32	
9. HM366588 <i>A. phagocytophilum</i> Kh-Ip80 Russia (Tick)	0.00	0.00	1.08	1.30	1.30	1.34	1.06	0.00		0.29	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27	0.27	0.01	0.00	0.29	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.32	0.00	0.32	0.32	
10. JF807994 <i>Anaplasma</i> sp. EK155 Turkey (Goat)	1.28	1.28	1.40	0.01	0.00	0.05	1.36	1.28	1.28		0.00	0.29	0.29	0.29	0.32	0.32	0.29	0.29	0.01	0.01	0.29	0.32	0.00	0.29	0.00	0.32	0.29	0.29	0.29	0.00	0.00	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.01	0.01	0.29	0.01	0.01		
11. JF807995 <i>Anaplasma</i> sp. EK144 Turkey (Sheep)	1.28	1.28	1.40	0.01	0.00	0.05	1.36	1.28	1.28	0.00		0.29	0.29	0.29	0.32	0.32	0.29	0.29	0.01	0.01	0.29	0.32	0.00	0.29	0.00	0.32	0.29	0.29	0.29	0.00	0.00	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.01	0.01	0.29	0.01	0.01		
12. JN656375 <i>A. phagocytophilum</i> 10100 Turkey (Dog)	0.00	0.00	1.08	1.30	1.30	1.34	1.06	0.00	0.00	1.28	1.28		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27	0.27	0.01	0.00	0.29	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.32	0.00	0.32	0.32	
13. JX627377 <i>A. phagocytophilum</i> TR8323 Germany (Tick)	0.00	0.00	1.08	1.30	1.30	1.34	1.06	0.00	0.00	1.28	1.28	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27	0.27	0.01	0.00	0.29	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.32	0.00	0.32	0.32	
14. JX627378 <i>A. phagocytophilum</i> TR6823 Germany (Tick)	0.00	0.00	1.08	1.30	1.30	1.34	1.06	0.00	0.00	1.28	1.28	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.27	0.27	0.01	0.00	0.29	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.32	0.00	0.32	0.32	
15. JX909354 <i>A. phagocytophilum</i> 6EG1170 Germany (Tick)	0.00	0.00	1.11	1.34	1.34	1.38	1.08	0.00	0.00	1.31	1.31	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.29	0.29	0.01	0.00	0.32	0.00	0.32	0.01	0.00	0.00	0.00	0.32	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38	0.36	0.00	0.35	0.35	
16. JX909355 <i>A. phagocytophilum</i> 125NA133 Germany (Tick)	0.00	0.00	1.11	1.34	1.34	1.38	1.08	0.00	0.00	1.31	1.31	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.29	0.29	0.01	0.00	0.32	0.00	0.32	0.01	0.00	0.00	0.00	0.32	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38	0.36	0.00	0.35	0.35		
17. JX909360 <i>A. phagocytophilum</i> 4NA115 Germany (Tick)	0.00	0.00	1.08	1.30	1.30	1.34	1.06	0.00	0.00	1.28	1.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.27	0.27	0.01	0.00	0.29	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.32	0.00	0.32	0.32	
18. KC583436 <i>A. phagocytophilum</i> Omsk-vole121 Russia (Vole)	0.00	0.00	1.08	1.30	1.30	1.34	1.06	0.00	0.00	1.28	1.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.27	0.27	0.01	0.00	0.29	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.32	0.00	0.32	0.32	
19. KC916730 <i>A. phagocytophilum</i> 1-2a China (Dove)	1.24	1.24	1.40	0.02	0.01	0.05	1.36	1.24	1.24	0.01	0.01	1.24	1.24	1.24	1.28	1.28	1.24	1.24		0.00	0.26	0.29	0.01	0.27	0.01	0.29	0.27	0.27	0.27	0.01	0.00	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.01	0.01	0.27	0.01	0.01		
20. KC916731 <i>A. phagocytophilum</i> 3-40a China (Owl)	1.24	1.24	1.40	0.02	0.01	0.05	1.36	1.24	1.24	0.01	0.01	1.24	1.24	1.24	1.28	1.28	1.24	1.24	0.00		0.26	0.29	0.01	0.27	0.01	0.29	0.27	0.27	0.27	0.01	0.00	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.01	0.01	0.27	0.01	0.01		
21. KF034787 <i>A. phagocytophilum</i> H116 Turkey (Tick)	0.01	0.01	1.11	1.30	1.30	1.34	1.08	0.01	0.01	1.28	1.28	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	1.24	1.24		0.01	0.29	0.01	0.29	0.01	0.01	0.01	0.01	0.29	0.26	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.34	0.32	0.01	0.32	0.32
22. KF242586 <i>A. phagocytophilum</i> IM160 Germany (Hedgehog)	0.00	0.00	1.11	1.34	1.34	1.38	1.08	0.00	0.00	1.31	1.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.28	1.28	0.01		0.32	0.00	0.32	0.01	0.00	0.00	0.00	0.32	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38	0.36	0.00	0.35	0.35	
23. KF459965 <i>A. phagocytophilum</i> C139 Turkey (Sheep and Goat)	1.28	1.28	1.40	0.01	0.00	0.05	1.36	1.28	1.28	0.00	0.00	1.28	1.28	1.28	1.31	1.31	1.28	1.28	0.01	0.01	1.28	1.31		0.29	0.00	0.32	0.29	0.29	0.29	0.00	0.00	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.01	0.01	0.29	0.01	0.01		
24. KF481933 <i>A. phagocytophilum</i> 77HNIRQ Slovakia (Tick)	0.00	0.00	1.08	1.30	1.30	1.34	1.06	0.00	0.00	1.28	1.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.24	1.24	0.01	0.00	1.28		0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.32	0.00	0.32	0.32	
25. KJ183079 <i>A. phagocytophilum</i> UK 40 Turkey (Sheep)	1.28	1.28	1.40	0.01	0.00	0.05	1.36	1.28	1.28	0.00	0.00	1.28	1.28	1.28	1.31	1.31	1.28	1.28	0.01	0.01	1.28	1.31	0.00	1.28		0.32	0.29	0.29	0.29	0.00	0.00	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.01	0.01	0.29	0.01	0.01		
26. KJ195692 <i>A. phagocytophilum</i> H556 Turkey (Tick)	0.00	0.00	1.08	1.34	1.34	1.38	1.06	0.00	0.00	1.31	1.31	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	1.28	1.28	0.01	0.01	1.31	0.00	1.31		0.00	0.00	0.00	0.32	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.39	0.36	0.00	0.37	0.37		
27. KJ769156 <i>A. phagocytophilum</i> DM1421 Germany (Tick)	0.00	0.00	1.08	1.30	1.30	1.34	1.06	0.00	0.00	1.28	1.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.24	1.24	0.01	0.00	1.28	0.00	1.28	0.00		0.00	0.00	0.29	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.32	0.00	0.32	0.32		
28. KM215229 <i>A. phagocytophilum</i> EU343 Slovenia (Tick)	0.00	0.00	1.08	1.30	1.30	1.34	1.06	0.00	0.00	1.28	1.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.24	1.24	0.01	0.00	1.28	0.00	1.28	0.00	0.00		0.00	0.29	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.32	0.00	0.32	0.32		
29. KM215234 <i>A. phagocytophilum</i> EU108 Slovenia (Tick)	0.00	0.00	1.08	1.30	1.30	1.34	1.06	0.00	0.00	1.28	1.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.24	1.24	0.01	0.00	1.28	0.00	1.28	0.00	0.00	0.00		0.29	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.32	0.00	0.32	0.32		
30. KM285229 <i>A. phagocytophilum</i> ApGGo4 Tunisia (Goat)	1.28	1.28	1.40	0.01	0.00	0.05	1.36	1.28	1.28	0.00	0.00	1.28	1.28</																														

Kayseri yöresinden toplanan kene örneklerinden elde edilen *A. phagocytophilum* izolatları ile Dünya'da ve Türkiye'de GenBank'a kayıtlı benzer diğer bazı izolatların, partial 16S rRNA gen bölgelerinin çoklu hizalamaları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



	200	250	300	350	400	450	500	550	600	650	700	750	800	850	900	950	1000
1. AB196720	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
2. AB196721	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
3. AB287396	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
4. AB604782	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
5. AB604783	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
6. AB604784	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
7. DQ105867	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
8. EF068227	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
9. HM366588	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
10. JF807894	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
11. JF807895	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
12. JN656375	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
13. JX627377	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
14. JX627378	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
15. JX909354	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
16. JX909355	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
17. JX909360	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
18. KC583436	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
19. KC816730	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
20. KC816731	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
21. KF034787	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
22. KF242586	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
23. KF456965	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
24. KF481933	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
25. KJ183079	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
26. KJ196882	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
27. KJ1789156	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
28. KM215229	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
29. KM215234	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
30. KM395229	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
31. KM395230	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
32. KP245906	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
33. KP245907	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
34. KP245908	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
35. KP475629	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
36. KT070825	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
37. KT944028	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
38. KT944029	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
39. KT951192	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
40. TRApHagHmar	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T
41. TRApHagHfur	T	C	A	G	C	C	A	C	A	C	T	G	G	A	A	C	T

	530540550560570580590600
D> 1. AB196720	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTGAGTCCGGAGAGGATAGCGGA
D> 2. AB196721	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTGAGTCCGGAGAGGATAGCGGA
D> 3. AB287386	GGTGAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGA
D> 4. AB604782	AGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGA
D> 5. AB604783	AGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGA
D> 6. AB604784	AGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGA
D> 7. DQ105667	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGA
D> 8. EF068227	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGA
D> 9. HM366588	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGA
D> 10. JF807894	
D> 11. JF807895	
D> 12. JN656375	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC
D> 13. JN627377	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC
D> 14. JN627378	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC
D> 15. JN909354	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC
D> 16. JN909355	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC
D> 17. JN909360	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC
D> 18. KC583436	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGA
D> 19. KC916730	
D> 20. KC916731	
D> 21. KF034787	TGAGTCCGGAGAGGATAGCGGA
D> 22. KF242586	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC
D> 23. KF458965	
D> 24. KF481833	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC
D> 25. KJ183079	
D> 26. KJ195662	
D> 27. KJ769156	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCTTTTAATA
D> 28. KM215229	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGA
D> 29. KM215234	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGA
D> 30. KM285229	
D> 31. KM285230	
D> 32. KP245806	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCT
D> 33. KP245807	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAG
D> 34. KP245808	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAG
D> 35. KP745629	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGA
D> 36. KT070825	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCTTTTA
D> 37. KT944028	
D> 38. KT944029	
D> 39. KT951192	TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGA
D> 40. TRAphagHmar	
D> 41. TRAphagRtur	
	610620630640650660670680
D> 1. AB196720	ATTCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGG
D> 2. AB196721	ATTCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGG
D> 3. AB287386	ATTCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGG
D> 4. AB604782	ATTCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGG
D> 5. AB604783	ATTCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGG
D> 6. AB604784	ATTCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGG
D> 7. DQ105667	ATTCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGG
D> 8. EF068227	
D> 9. HM366588	ATTCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGG
D> 10. JF807894	
D> 11. JF807895	
D> 12. JN656375	
D> 13. JN627377	
D> 14. JN627378	
D> 15. JN909354	
D> 16. JN909355	
D> 17. JN909360	
D> 18. KC583436	ATTCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGG
D> 19. KC916730	
D> 20. KC916731	
D> 21. KF034787	ATTCTAGTGTAGAGGTGAAATTCG
D> 22. KF242586	
D> 23. KF458965	
D> 24. KF481833	
D> 25. KJ183079	
D> 26. KJ195662	
D> 27. KJ769156	
D> 28. KM215229	ATTCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGG
D> 29. KM215234	ATTCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGG
D> 30. KM285229	
D> 31. KM285230	
D> 32. KP245806	
D> 33. KP245807	
D> 34. KP245808	
D> 35. KP745629	ATTCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGG
D> 36. KT070825	
D> 37. KT944028	
D> 38. KT944029	
D> 39. KT951192	ATTCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGG
D> 40. TRAphagHmar	
D> 41. TRAphagRtur	

	760	780	800	820	840	860
1. AB196720	TCT	CGTGT	TAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
2. AB196721	TCT	CGTGT	TAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
3. AB287386	T					
4. AB604782	TCT	GTGTT	GTAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
5. AB604783	TCT	GTGTT	GTAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
6. AB604784	TCT	GTGTT	GTAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
7. DQ105867						
8. EF088227						
9. HM366588	TCT	GTGTT	GTAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
10. JF807894	C	CGTGT	TAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
11. JF807895	C	CGTGT	TAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
12. JX656375						
13. JX627377						
14. JX627378						
15. JX909354						
16. JX909355						
17. JX909360						
18. KC583436	TCT	GTGTT	GTAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
19. KC916730	TC	CGTGT	TAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
20. KC916731	TC	CGTGT	TAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
21. KF034787						
22. KF242586						
23. KF459065						
24. KF481933						
25. KJ183079						
26. KJ195892						
27. KJ789156						
28. KM215228	TCT	GTGTT	GTAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
29. KM215234	TCT	GTGTT	GTAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
30. KM285229	TCT	GTGTT	GTAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
31. KM285230	TC	CGTGT	TAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
32. KP245806						
33. KP245807						
34. KP245808						
35. KP745629						
36. KT070825						
37. KT494028	TCT	GTGTT	GTAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
38. KT444028	TCT	GTGTT	G	AGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCGCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
39. KT851192	TCT	GTGTT	G	AGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCGCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
40. TRAnhojHmar	TCT	GTGTT	GTAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA
41. TRAnhojPur	TCT	GTGTT	GTAGCTAAC	CGGTTAAG	CACTCCG	CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAA

	870	880	890	900	910	920	930	940
1. AB196720	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
2. AB196721	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
3. AB287396								
4. AB604782	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
5. AB604783	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
6. AB604784	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
7. D0105667								
8. EF088227								
9. HM366588	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
10. JF807994	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
11. JF807995	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
12. JN656375								
13. JN627377								
14. JN627378								
15. JN909354								
16. JN909355								
17. JN909360								
18. KC583436	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
19. KC916730	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
20. KC916731	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
21. KF034787								
22. KF242586								
23. KF459965	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
24. KF481933								
25. KJ183079	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
26. KJ195692								
27. KJ769156								
28. KM215229	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACAT						
29. KM215234	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACAT						
30. KM285229	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
31. KM285230	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
32. KP245906								
33. KP245907								
34. KP245908								
35. KP745629	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
36. KT070825								
37. KT944028	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
38. KT944029	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
39. KT951192	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
40. TRApHagHmr	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAC	TCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGA						
41. TRApHagHnr								

	950	960	970	980	990	1,000	1,010	1,020	1,030
1. AB196720	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
2. AB196721	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
3. AB287396									
4. AB604782	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
5. AB604783	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
6. AB604784	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
7. D0105667									
8. EF088227									
9. HM366588	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
10. JF807994	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
11. JF807995	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
12. JN656375									
13. JN627377									
14. JN627378									
15. JN909354									
16. JN909355									
17. JN909360									
18. KC583436	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
19. KC916730	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
20. KC916731	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
21. KF034787									
22. KF242586									
23. KF459965	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
24. KF481933									
25. KJ183079	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
26. KJ195692									
27. KJ769156									
28. KM215229									
29. KM215234									
30. KM285229	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
31. KM285230	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
32. KP245906									
33. KP245907									
34. KP245908									
35. KP745629	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
36. KT070825									
37. KT944028	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
38. KT944029	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
39. KT951192	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
40. TRApHagHmr	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							
41. TRApHagHnr	AGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACG							

1,300

1,310

1,320

1,330

1,340

1,350

1,360

1,370

Chr 1: AB196720

Chr 2: AB196721

Chr 3: AB287396

Chr 4: AB604782

Chr 5: AB604783

Chr 6: AB604784

Chr 7: DQ105667

Chr 8: EF068227

Chr 9: HM366588

Chr 10: JF807994

Chr 11: JF807995

Chr 12: JN585375

Chr 13: JX627377

Chr 14: JX627378

Chr 15: JX909354

Chr 16: JX909355

Chr 17: JX909360

Chr 18: KC583436

Chr 19: KC616730

Chr 20: KC916731

Chr 21: KP034787

Chr 22: KP242586

Chr 23: KP458065

Chr 24: KP481933

Chr 25: KJ183079

Chr 26: KJ195692

Chr 27: KJ3789156

Chr 28: KM215229

Chr 29: KM215234

Chr 30: KM285229

Chr 31: KM285230

Chr 32: KP245806

Chr 33: KP245807

Chr 34: KP245808

Chr 35: KP245629

Chr 36: KT070825

Chr 37: KT944028

Chr 38: KT944029

Chr 39: KT951192

Chr 40: TRApnagHmar

Chr 41: TRApnagHtur

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC

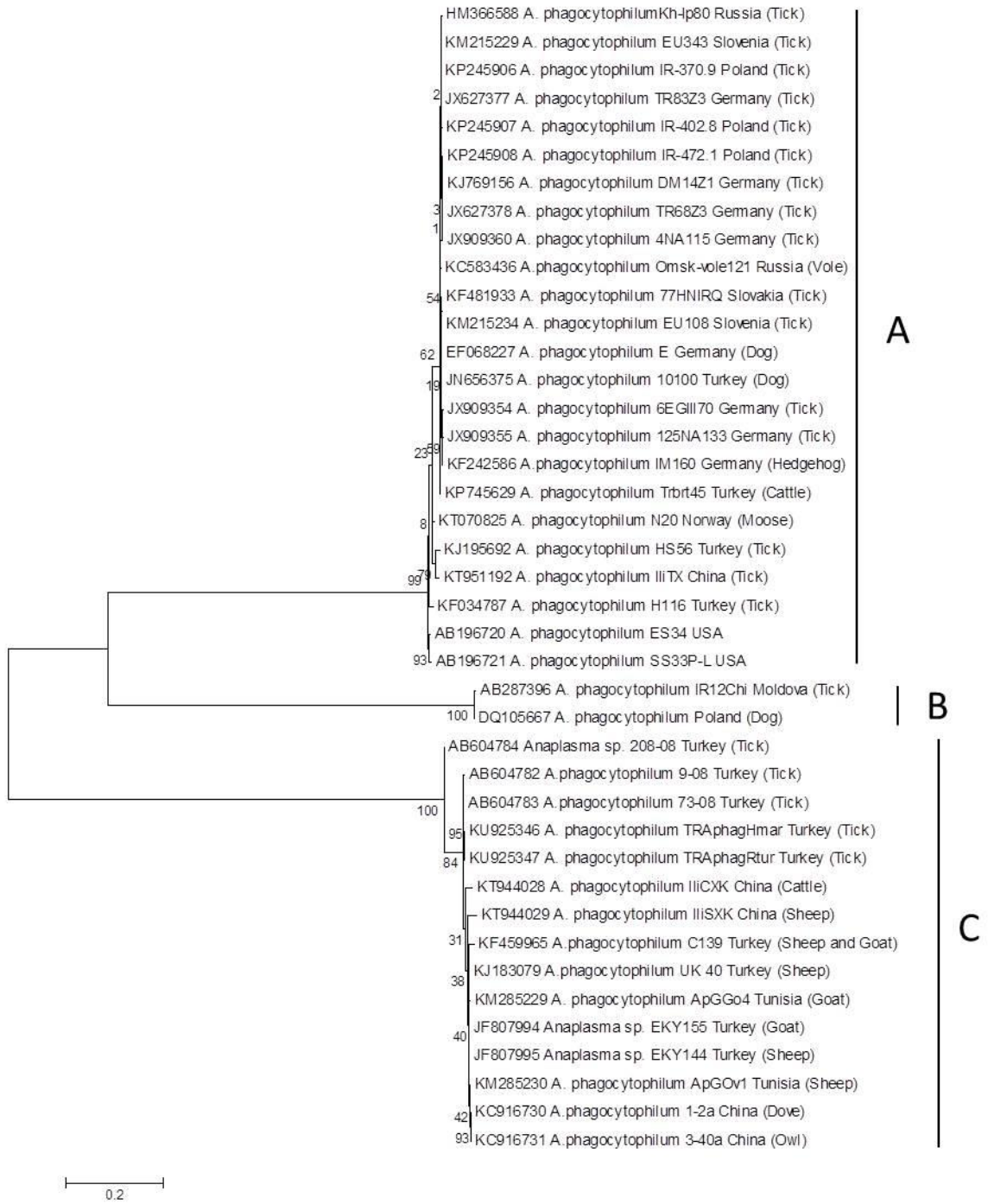
ATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGTACACACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGC



Şekil 4.18. Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış örneklerinde belirlenen *A. phagocytophilum* izolatları ile Dünya'daki ve Türkiye'deki diğer bazı *A. phagocytophilum* izolatlarının partial 16S rRNA gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları

Şekil 4.18'de görüldüğü gibi 16S rRNA gen bölgesine göre sığır, koyun, keçi, köpek, kirpi ve geyik gibi hayvanlarda ve ixodid kenelerde belirlenen *A. phagocytophilum* nesilleri arasında çeşitli nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. *A. phagocytophilum* izolatlarının 16S rRNA gen bölgesine göre maximum likelihood metodu (Kimura 2 Parameter modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.19'da verilmiştir. Şekil 4.19'da görüldüğü üzere Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış *Hyalomma marginatum* ve *Rhipicephalus turanicus* örneklerinde belirlenen *A. phagocytophilum* izolatları ile Dünya'dan ve Türkiye'den daha önce GenBank'a girilmiş izolatların 3 ana dalda (A, B ve C kümeleri) kümelendikleri belirlenmiştir. A grubunda kümelenmiş izolatların genellikle kenelerden elde edildikleri görülmüş olup bunun yanında kirpi, rodent, köpek, sığır ve geyikten elde edilen izolatların da bu kümede bulundukları belirlenmiştir. B grubunda kümelenen iki izolatın birisinin keneden birisinin de köpekten elde edildiği saptanmıştır. Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış kenelerden elde edilen TRAphagHmar ve TRAphagRtur izolatlarının da yer aldığı C kümesinde ise genellikle daha önce Türkiye'den girilmiş ve kenelerle koyun ve keçilerden elde edilmiş *A. phagocytophilum* izolatlarının bulunduğu ve ayrıca bu kümede güvercin, baykuş ve sığırlardan elde edilmiş izolatların da yer aldığı saptanmıştır. A ve B gruplarındaki *A. phagocytophilum* izolatlarının homolog oldukları,

C grubunda yer alan izolatların ise kendi aralarında ortalama %0,2'lik genetik farklılığın bulunduğu belirlenmiştir. Gruplar arasındaki genetik farklılıklara bakıldığında ise; A grubundaki izolatların B grubundakilerle %10,8±2,0, C grubundakilerle ise %13,0±2,7; B grubundaki izolatların C grubundaki izolatlarla arasındaki ortalama genetik farklılık %13,8±2,8 saptanmıştır. TRAphagHmar ve TRAphagRtur izolatlarının kendi aralarında %100 identik oldukları tespit edilmiştir. TRAphagHmar ve TRAphagRtur izolatlarının, Türkiye'den daha önce girilmiş ve *Ixodes ricinus* kenelerinden elde edilmiş 9-08 (AB604782), 73-08 (AB604783) ve 208-08 (AB604784) izolatlarıyla (C grubunda) arasındaki genetik farklılığın sırasıyla %0,09, %0,05 ve %0,58 olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'den daha önce girilmiş ve koyun ve keçilerden elde edilmiş UK 40 (KJ183079), C139 (KF459965), EKY 144 (JF807995) ve EKY 155 (JF807994) izolatlarıyla (C grubunda) TRAphagHmar ve TRAphagRtur izolatları arasındaki genetik farklılık ise %0,09 saptanmıştır. A grubunda yer alan ve Türkiye'den sığır, köpek ve *Haemaphysalis sulcata* ile türü belirtilmemiş keneden girilmiş Trbrt45 (KP745629), 10100 (JN656375), H116 (KF034787) ve HS56 (KJ195692) izolatlarıyla TRAphagHmar ve TRAphagRtur arasındaki genetik farklılık da ilk üç izolat için %13,26 ve sonuncu HS56 izolatı için ise %13,66 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.19. Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanan kene örneklerinde saptanan *A. phagocytophilum* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer *A. phagocytophilum* izolatlarının 16S rRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Maximum Likelihood - Kimura 2 Parameter modeli, 1000 bootstrap). Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Rickettsiales dizisi, Anaplasmataceae ailesindeki *Anaplasma* türlerinin meydana getirdiği anaplasmosis, tropik ve subtropik iklim kuşağındaki bölgelerdeki memeli hayvanlarda görülen ve büyük ekonomik kayıplara neden olan enfeksiyöz bir hastalıktır. Hastalık sığırlarda eritrositlerin yıkımına sebep olmaktadır. Anaplasmosis sığırlara vektör keneler tarafından biyolojik olarak nakledilmekte olup bazı kan emici sinekler de *Anaplasma* türlerini mekanik olarak nakledebilmektedir. Ayrıca enjektörler, kulak küpeleri, boynuz kesme veya kastrasyon ekipmanları gibi kanla kontamine cisimler de sığırlar arasında anaplasmosis'in yayılmasına sebep olabilmektedir. Bazı durumlarda transplasental bulaşma da görülebilmektedir. Bütün yaş grubundaki sığırlar anaplasmosis'e karşı duyarlıdır. Sığırlarda anaplasmosis'e yol açan türler *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum* ve *A. bovis*'tir. *A. phagocytophilum* önceleri *Ehrlichia phagocytophila* ve *E. equi* olarak bilinmekteydi. Anaplasmosis sığırlarda anemi, ikterus, yüksek ateş, öksürük gibi klinik semptomlarla seyretmekte olup yavru atımına ve verim kayıplarına da yol açarak büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (1-3). Sığır anaplasmosis'i birçok ülkede yüksek morbidite ve mortaliteye bağlı olarak önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu hastalığa bağlı ekonomik kayıplar, yalnızca ölümlere bağlı olmamakla birlikte yavru atımı, et ve süt kaybı gibi verim kayıplarına ilaveten kontrol giderleri (ilaçlama, aşılama, tedavi vb.) de ekonomik kayıpları artırmaktadır. Sığırlarda anaplasmosis'e bağlı ekonomik kayıpların Amerika Birleşik Devletleri'nde 300 milyon doların üzerinde olduğu tahmin edilmektedir. Aynı şekilde Latin Amerika ülkelerinde ise bu oranın yaklaşık 800 milyon dolar olduğu bildirilmektedir (73). Sığırlarda anaplasmosis'e yol açan *A. phagocytophilum* insanlarda da hastalığa yol açabilmektedir. Bu *Anaplasma* türü insanlarda granulositik ehrlichiosis

etkenidir (1, 2).

Anaplasma phagocytophilum insanlarla evcil ve yabani hayvanlara Ixodidae ailesindeki kenelerle nakledilmektedir (91, 92). Keneler, insanlarda ve hayvanlarda görülen ve zoonotik öneme sahip birçok paraziter, bakteriyel ve viral patojenlerin en önemli vektörlerindendir. Son yıllarda global ölçekte insan ve hayvan hareketlerinde artış, sosyoekonomik ve çevresel değişiklikler ile özellikle küresel ısı artışı çeşitli kene türlerinin coğrafik yayılışlarında artışlara neden olmuştur. Bu durum, kene kaynaklı patojenlerin risk potansiyelini artırarak emerging/re-emerging karakterli enfeksiyonların da global bir tehdit oluşturmalarına yol açmıştır (93). Kenelerin dağılımı ve yaygınlığı direkt olarak halk sağlığı problemi olup özellikle çiftlik hayvanı yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgelerde keneler, insan enfeksiyonlarının rezervuar konakları olabilmekte veya direkt olarak enfeksiyonları nakledebilmektedir. Konaklarından veya sahadan toplanan kenelerin ve bu kenelerde kene kaynaklı patojenlerin moleküler olarak belirlenmesi, coğrafik bir bölgede yeni ortaya çıkan kene kaynaklı hastalıkların risk faktörlerinin değerlendirilmesinde kullanışlı olmaktadır (94, 95). *Anaplasma phagocytophilum*'un tüm dünyada bilinen vektörleri *Ixodes pacificus*, *I. scapularis* ve *I. ricinus*'tur (91, 92). Bu türlerden özellikle *I. ricinus* Türkiye'de daha yoğun olarak Karadeniz, Ege ve Akdeniz bölgeleri gibi nemli ve ılıman iklim özelliklerinin hüküm sürdüğü ormanlık alanlarda bulunmaktadır (96-99). Bununla birlikte, *A. phagocytophilum*'un dünyanın ve Türkiye'nin farklı bölgelerinde farklı soylardaki ixodid kene türlerinde tespit edilmiş olması, *Ixodes* türleri dışındaki kene türlerinin de bu patojeni nakledebileceğini göstermektedir (100, 101). Nitekim Türkiye'de daha önce yapılmış çalışmalarda (11, 101, 102) *Haemaphysalis sulcata*, *Hyalomma marginatum* ve *H. excavatum* türlerinde pozitiflik bildirilmiştir. Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanan farklı türlerdeki keneler üzerine yapılmış bu çalışmamızda da *A. phagocytophilum* pozitifliği *Hyalomma marginatum* ve *Rhipicephalus turanicus* türlerinde belirlenmiş olup bu sonuç, *A. phagocytophilum*'un *Ixodes* türleri dışındaki kene türleri tarafından da nakledilebileceği hipotezini doğrular niteliktedir. Ancak *Hyalomma marginatum* ve *Rhipicephalus turanicus* türlerinde belirlenen bu pozitifliğin enfekte sığırlardan kan emme esnasında bu kenelere nakledilmiş olma olasılığı oldukça yüksektir. Bu yüzden *A. phagocytophilum*'un ana vektörleri olan *Ixodes* türleri dışında diğer kene türlerinin de yapılacak laboratuvar tabanlı çalışmalarla vektörlük potansiyelleri hakkında daha ayrıntılı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Türkiye’de sığırlarda ve kenelerde *Anaplasma* türlerinin araştırılması konusundaki bilgiler oldukça sınırlıdır. Yapılan az sayıdaki çalışmada mikroskopik, serolojik ve son yıllarda moleküler olarak sığırlarda *Anaplasma* türlerinin varlığı ortaya konulmuş olup bu çalışmalar genellikle *A. marginale* ve *A. centrale* türleri üzerine yoğunlaşmıştır (96, 103-105). Çakmak (105), Ankara Beytepe’de 123 sığır serum örneğinden CF testi ile 4 serum örneğinde *A. marginale*’ye spesifik antikorların varlığı tespit etmiştir. Yine Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi çiftliğinde yapılan bir araştırmada mikroskopik olarak 17 sığırdan anaplasmosis teşhisi konulduğu rapor edilmiştir (5). Afyon’da 506 sığır kan serumu örneği cELISA yöntemi ile bakılmış ve bunların 312’si *A. marginale* pozitif belirlenmiştir (104). Karagenç ve ark. (103) Aydın yöresi sığırlarında RLB testiyle 120 kan örneğinin 16’sında *A. centrale*, 8’inde ise *A. marginale*’ye rastlamış ve türlere göre enfeksiyon oranlarını *A. centrale* % 13,3 ve *A. marginale* için % 6,6 olarak rapor etmişlerdir. Gökçe ve ark. (106) 2002 yılında Karadeniz Bölgesi’nde toplam 720 sığır kan örneğinin 73’ünde mikroskopik olarak *A. phagocytophilum*’a benzer organizmalar tespit etmişler ve serolojik olarak IFAT ile 720 örneğin 110’nunun *A. phagocytophilum* yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar moleküler olarak 183 örneğin PCR ile incelemiş ve 27’sinde (%3,75) *A. phagocytophilum* pozitifliği saptamışlardır. Birdane ve ark. (6)’nın 645 sığır üzerinde yaptığı bir araştırmada sığırların mikroskopik olarak %34,11’nin, serolojik olarak ise %55,35’nin *A. marginale* yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada sığırlarda anaplasmosis yönünden serolojik olarak cELISA ve IFA testlerinin kıyaslaması yapılmıştır (7). Bu çalışmada 484 sığırın 69’nun mikroskopik olarak, 287’sinin de serolojik olarak *A. marginale* yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir. Bir başka çalışmada doğal olarak *A. marginale* ile enfekte ineklerde akut faz proteinleri, klinik, hematolojik ve biyokimyasal parametrelere bakılmıştır (8). Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalarda hem sığırlarda hem de vektör kenelerde anaplasmosis yönünden araştırmalar yapılmıştır. Aktas ve ark. (9), 389 sığır üzerinde yaptıkları moleküler çalışmada *Anaplasma* enfeksiyonlarını %9 olarak rapor etmişlerdir. Bu çalışmada sığırlarda anaplasmosis’e yol açan türlerin moleküler prevalansının ise %2,8 *A. marginale*, %1 *A. centrale* ve %1 *A. phagocytophilum* olduğu belirtilmiştir. Moleküler olarak vektör keneler üzerinde yapılan çalışmalarda; Karadeniz Bölgesi’nden toplanan kenelerde *A. phagocytophilum* prevalansı %11,6 olarak bildirilmiştir (10). Aynı bölgede keneler üzerine yapılan bir başka moleküler çalışmada

ise kenelerin %6,78'nin *A. phagocytophilum*, %6,56'sının ise *A. centrale* ile enfekte olduğu saptanmıştır (11). Trakya bölgesinde keneler üzerine yapılan bir diğer moleküler çalışmada *A. phagocytophilum*'un İstanbul'da %2,7, Kırklareli'nde ise %17,5 olduğu tespit edilmiştir (12). Aydın yöresinde yapılan bir başka çalışmada oluşturulan 20 kene DNA havzunda; *H. excavatum* ve *H. marginatum*'un bulunduğu 4 havuzda sadece *A. phagocytophilum*, *H. marginatum*'un bulunduğu iki havuzda sadece *A. marginale*, *H. excavatum* ve *H. marginatum*'un bulunduğu iki havuzda ise eş zamanlı olarak *A. marginale* ve *A. phagocytophilum* pozitifliği rapor edilmiştir (102). Kayseri yöresinde sığırlardan toplanan keneler üzerinde yapılan çalışmamızda, Türkiye'de ilk kez TaqMan prob tabanlı real time PCR tekniği kullanılmış ve incelemesi yapılan 265 ergin ixodid kene örneğinden bir *Rh. turanicus* ve bir *H. marginatum* DNA'sında %0,75 *A. phagocytophilum* pozitifliği belirlenmiştir. Elde edilen sonucun, Türkiye'de daha önce yapılmış bazı moleküler çalışma (8, 9) sonuçlarıyla çok benzer olduğu, bazı çalışma (11, 12, 102) sonuçlarına göre ise biraz daha düşük bir oran olduğu dikkati çekmiştir. Bu sonuçların, yapılan çalışma bölgelerindeki hayvan hareketleri ve vektör kene popülasyonu gibi faktörlere göre değişkenlik gösterebildiği kanaatine varılmıştır.

Anaplasmosis'in Dünya'daki prevalansına bakıldığında bu hastalığın özellikle Amerika kıtasında çok önemli ve yaygın olduğu görülmektedir. Tüm Dünya'da yapılan çalışmaların çoğu seroprevalans çalışmaları olup moleküler çalışmaların genellikle prevalans çalışması yerine genetik karakterizasyon çalışmaları şeklinde olduğu gözlenmektedir. Az sayıda yapılan mikroskopik çalışmada sığırlarda anaplasmosis'in mikroskopik prevalansı; Amerika Birleşik Devletleri'nde (A.B.D) %4,8-29 (13), İran'da %80,3 (14), Cezayir'de %7,4 (15) ve Suudi Arabistan'da %0,98 (16) olarak rapor edilmektedir. Serolojik prevalans çalışmalarında sığırlarda anaplasmosis'in prevalansı; Macaristan'da %80,8 (17), İsviçre'de %95 (18), İtalya'da %11,5 (19), Avusturya'da %2,1 (20), Malezya'da %77,6 (21), Mozambik'te %63-76,5 (22, 23), Kosta Rika'da %37,2 (24), A.B.D'de %7,1-15,17 (25-28), Porto Riko'da %22-27,4 (29, 30), Brezilya'da %58,74-97 (31, 32), Guetamala'da %87,5 (33), Meksika'da %54,6-69,75 (34, 35), Bolivya'da %6-32 (36), Venezuela'da %47 (37), Küba'da %43 (38), Paraguay'da %92 (39), Kenya'da %58 (40), Güney Afrika'da %26-98,6 (41-44), Sudan'da %6,1-38,9 (45, 46), Tanzanya'da %20-37 (47) ve Zambiya'da %14,7-38,6 (48) olarak bildirilmektedir. Moleküler çalışmalar genellikle karakterizasyon çalışması

şeklinde olup az sayıdaki moleküler prevalans çalışmasına göre sığırlarda anaplasmosis yaygınlığı; Hindistan'da %45,2 (49), Macaristan'da %92 (50), A.B.D'de %57,1-92,8 (13) ve Meksika'da %69,2 (34) olarak belirtilmektedir. Dünyada *A. phagocytophilum*'un kenelerdeki prevalansı üzerine yapılmış çalışmalarda prevalans oranlarının; Almanya'da %1,0-4,5 (107-109), Fransa'da %0,4-15,0 (110, 111), İtalya'da %2,99-57,14 (112-114), İskoçya'da %0,25-2,0 (115), Estonya'da %3 (116), Avusturya'da %5,1-8,7 (117, 118), İsviçre'de %0,5-2,2 (119-121), Danimarka'da %40,5 (122) ve Doğu Avrupa ülkelerinde %14'lerde (70, 123-126) olduğu rapor edilmiştir. Gerek sığırlarda gerekse keneler üzerinde dünyada yapılan çalışmalarda anaplasmosis'in prevalans oranlarının değişkenlik gösterdiği ve bu sonuçların bu denli farklılık göstermesinin de vektör kene popülasyonu, hayvan hareketleri ve iklim koşulları gibi birçok faktöre bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Sığırlarda *Anaplasma* türlerinin tespit edilmesinde mikroskopik muayene özellikle de paraziteminin düşük olduğu durumlarda yetersiz kalabilmektedir. Hastalığı atlatmış hayvanlar vücutlarında çok az da olsa etkeni taşıyabilmektedir. Dolayısıyla bu durumdaki hayvanların kanlarından yapılan frotilerde etkenin saptanması çok zor olabilmektedir. Kanda etken görülse dahi, bunun hangi tür olduğunun tespiti de yanıltıcı durumlar doğurabilir. Ayrıca mikroskopik muayene için deneyimli personele ihtiyaç bulunmaktadır. Sığırlarda *Anaplasma* türlerinin teşhisinde sıklıkla tercih edilen ve parazite karşı oluşan antikorların tespiti amacıyla kullanılan serolojik yöntemlerin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Sığır kanında etken bulunmasa dahi parazite ait antikorlar varlığını sürdürebilmekte, dolayısıyla teşhiste yanlış veya çapraz pozitifliklere sebep olmaktadır. Buna karşın son yıllarda PCR tabanlı moleküler yöntemler çok sık kullanılmaya başlanmış ve bu yöntemler yüksek sensivite ve spesifitelerinden dolayı *Anaplasma* türlerinin gerek sığırlarda gerekse vektör kenelerde tespitinde kullanılan en duyarlı tanı yöntemleri olmuşlardır (127, 128). Kayseri yöresinde keneler üzerinde yapılmış çalışmamızda da *A. phagocytophilum*'un moleküler prevalansını belirlemek amacıyla PCR tabanlı diğer moleküler yöntemlere göre spesifikite ve sensitivitesi oldukça yüksek olan TaqMan prob tabanlı real time PCR tekniği kullanılmıştır. Real Time PCR analizleriyle pozitif belirlenen TRAphagHmar ve TRAphagRtur izolatlarının 16S rRNA gen bölgesi, duyarlılığı daha önceki çalışmalarda belirlenmiş (88) türe özgü spesifik primerler ile nested PCR analizleriyle çoğaltılarak elde edilen ürünlerin sekans analizleri gerçekleştirilmiş ve moleküler karakterleri ortaya

konulmuştur. Ribosomal RNA genleri, bütün bakteri türleri arasında oldukça yüksek korunmuşluğa sahip genler olup moleküler çalışmalarda patojen türlerin identifikasyonlarının tespiti ve filogenetik karakterlerinin ortaya konması açısından en sık tercih edilen gen bölgeleridir (61). 16S rRNA gen fragmentleri vektörlerdeki ve rezervuarlardaki bakteri DNA'larının tespitinde kullanılmaktadır. 16S rRNA markerlarının etkinliğinin amplifiye edilen gen bölgesine göre farklılık gösterdiği birçok çalışmada rapor edilmiştir. İnsan kanındaki kene kaynaklı patojenlerin tanımlandığı ilk çalışmalardan biri Chen ve ark. (63) tarafından rapor edilmiştir. Araştırmacılar 16S rRNA gen bölgesini amplifiye eden modifiye universal eubacterial primerleri (POmod ve PC5) ve internal GE9f/GE10r primerlerini kullanarak iki basamaklı PCR ile yaklaşık 919 bp'lik bir DNA bant profili elde etmişlerdir. Bu metodun etkinliği düşük bulunmuş olup HGA'lı (human granulocytic ehrlichiosis) hastaların yalnızca %50'sinde bu yöntemle *A. phagocytophilum* tespit edilebilmiştir. Benzer sonuçlar Bakken ve ark. (64) ve Comer ve ark. (65) tarafından da rapor edilmiştir. Araştırmacılar 16S rRNA gen fragmentlerinin insan anaplasmosis'inin erken teşhisinde yüksek sensitiviteye sahip olmadığı görüşüne varmışlardır. Gerçek sonuçları yansıtmayan GE9f/GE10r primer çifti anaplasmosis'in moleküler teşhisinde kullanılmış olup Slovenya'da ilk kez Avrupalı bir hastada *A. phagocytophilum* DNA'sının teşhisinde kullanılmıştır (66). İlerleyen yıllarda vektör ve rezervuarlarda *A. phagocytophilum*'un araştırılması amacıyla 16S rRNA gen bölgesini amplifiye eden ve yüksek sensitiviteye sahip yeni primerler geliştirilmiştir. Farklı primer çiftlerinin geliştirilmesi sonucu *A. phagocytophilum*'un farklı varyantları olduğu belirlenmiştir (61). *A. phagocytophilum* DNA'sının tespitinde PER1/PER2 (67, 68) ya da EHR747/EHR790 (69-72) gibi tek basamaklı PCR primerleri de bazen kullanılmaktadır. Birçok araştırmacıya göre ise 16S rRNA gen bölgesinin *A. phagocytophilum* DNA'sının saptanmasında diğer gen bölgelerine oranla daha etkili olduğu rapor edilmiştir (9, 81-83).

Çalışmamızda elde edilen izolatlarla dünyadan ve Türkiye'den daha önce girilmiş *A. phagocytophilum* izolatları arasındaki parwise kıyaslamalarında 16S rRNA gen bölgesine göre sığır, koyun, keçi, köpek, kirpi ve geyik gibi hayvanlarda ve ixodid kenelerde belirlenen *A. phagocytophilum* nesilleri arasında çeşitli nükleotid varyasyonları bulunduğu tespit edilmiştir. Maximum likelihood metodu (Kimura 2 Parameter modeli) ile oluşturulan filogenetik ağaçta, Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış *H. marginatum* ve *Rh. turanicus* örneklerinde belirlenen *A. phagocytophilum*

izolatları ile Dünya'dan ve Türkiye'den daha önce GenBank'a girilmiş izolatların 3 ana dalda (A, B ve C kümeleri) kümelendikleri belirlenmiştir. A grubunda kümelenmiş izolatların genellikle kenelerden elde edildikleri görülmüş olup bunun yanında kirpi, rodent, köpek, sığır ve geyikten elde edilen izolatların da bu kümede bulundukları belirlenmiştir. B grubunda kümelenen iki izolatın birisinin keneden birisinin de köpekten elde edildiği saptanmıştır. Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış kenelerden elde edilen TRAphagHmar ve TRAphagRtur izolatlarının da yer aldığı C kümesinde ise genellikle daha önce Türkiye'den girilmiş ve kenelerle koyun ve keçilerden elde edilmiş *A. phagocytophilum* izolatlarının bulunduğu ve ayrıca bu kümede güvercin, baykuş ve sığırlardan elde edilmiş izolatların da yer aldığı saptanmıştır. A ve B gruplarındaki *A. phagocytophilum* izolatlarının homolog oldukları, C grubunda yer alan izolatların ise kendi aralarında ortalama %0,2'lik genetik farklılığın bulunduğu belirlenmiştir. Gruplar arasındaki genetik farklılıklara bakıldığında ise; A grubundaki izolatların B grubundakilerle %10,8±2,0, C grubundakilerle ise %13,0±2,7; B grubundaki izolatların C grubundaki izolatlarla arasındaki ortalama genetik farklılık %13,8±2,8 saptanmıştır. TRAphagHmar ve TRAphagRtur izolatlarının kendi aralarında %100 identik oldukları tespit edilmiştir. TRAphagHmar ve TRAphagRtur izolatlarının, Türkiye'den daha önce girilmiş ve *Ixodes ricinus* kenelerinden elde edilmiş 9-08 (AB604782), 73-08 (AB604783) ve 208-08 (AB604784) izolatlarıyla (C grubunda) arasındaki genetik farklılığın sırasıyla %0,09, %0,05 ve %0,58 olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'den daha önce girilmiş ve koyun ve keçilerden elde edilmiş UK 40 (KJ183079), C139 (KF459965), EKY 144 (JF807995) ve EKY 155 (JF807994) izolatlarıyla (C grubunda) TRAphagHmar ve TRAphagRtur izolatları arasındaki genetik farklılık ise %0,09 saptanmıştır. A grubunda yer alan ve Türkiye'den sığır, köpek ve *Haemaphysalis sulcata* ile türü belirtilmemiş keneden girilmiş Trbrt45 (KP745629), 10100 (JN656375), H116 (KF034787) ve HS56 (KJ195692) izolatlarıyla TRAphagHmar ve TRAphagRtur arasındaki genetik farklılık da ilk üç izolat için %13,26 ve sonuncu HS56 izolatı için ise %13,66 olarak tespit edilmiştir. A grubunda yer alan izolatların büyük çoğunluğunun dünyanın farklı coğrafyalarındaki kenelerden elde edilmiş izolatlar olması ve çalışmamızda elde ettiğimiz izolatların ise A grubunda değil de Türkiye'den daha önce bildirilmiş ve genellikle koyun, keçi ve sığır gibi hayvanlardan elde edilmiş izolatların bulunduğu C grubunda yer alması, *H. marginatum* ve *Rh. turanicus* türlerinde belirlenen bu

pozitifliğin enfekte sığırlardan kan emme esnasında bu kenelere nakledilmiş olma olasılığını destekler nitelikte bulunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışmayla, Kayseri yöresindeki sığırlardan toplanmış kene örneklerinde 16S rRNA gen bölgesi yönünden *A. phagocytophilum*'un varlığı moleküler olarak araştırılmış ve genetik karakterleri ortaya konmuştur. Araştırma sonucunda, Türkiye'den ve dünyadan daha önce rapor edilmiş bulgular da değerlendirilerek *A. phagocytophilum* türlerinin sadece vektörlüğü kanıtlanmış *Ixodes* türlerinde değil, bunun yanında farklı soydaki diğer ixodid keneler tarafından da taşınabileceği hipotezi desteklenmiştir. Ancak bu hipotezin doğruluğunun ve farklı soylardaki diğer ixodid kene türlerinin de vektörlük potansiyellerinin kanıtlanabilmesi için bu konuda daha fazla araştırmaların yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Woldeiwet, Z., Scott, G.R. 1993. Tick-borne (pasture) fever. Woldehiwet Z, Ristic M. Eds. In: Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals. Pergamon Press, Oxford, pp. 233-254.
2. Bakken, J.S., Dumler, J.S., Chen, S.M., Eckman, M.R., Van Etta, L.L., Walker, D.H. 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States: a new species emerging? J Am Med Assoc, 272: 212-218.
3. Inokuma, H. 2007. Vectors and reservoir hosts of Anaplasmataceae. Raoult D, Parola P. Eds. In: Rickettsial Diseases. Taylor & Francis Group LLC, New York, pp. 199-212.
4. <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=247255&src=0>
5. Ozlem, M.B., Karaer, Z., Turgut, K., Eren, H., Irmak, K., İnci, A. 1988. Efficacy of long-acting oxytetracycline on bovine anaplasmosis. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 35 (1): 1-5
6. Birdane, F.M., Sevinc, F., Derinbay, O. 2006. Anaplasma marginale infections in dairy cattle: clinical disease with high seroprevalence. Bull Vet Inst Pulawy, 50: 467-470.
7. Ekici, O.D, Sevinc, F. 2011. Comparison of cELISA and IFA tests in the serodiagnosis of anaplasmosis in cattle. African Journal of Microbiology Research, 5(10): 1188-1191.
8. Coskun, A., Ekici, O.D., Guzelbektes, H., Aydogdu, U., Sen, I. 2012. Acute Phase Proteins, Clinical, Hematological and Biochemical Parameters in Dairy Cows Naturally Infected with Anaplasma marginale. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 18 (3): 497-502.

9. Aktas, M., Altay, K., Dumanli, N. 2011. Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey. *Ticks Tick Borne Dis*, 2(1): 62-65.
10. Aktas, M., Vatansever, Z., Altay, K., Aydin, M.F., Dumanli, N. 2010. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from Turkey. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 104(1):10-15.
11. Aktas, M., Altay, K., Ozubek, S., Dumanli, N. 2012. A survey of ixodid ticks feeding on cattle and prevalence of tick-borne pathogens in the Black Sea region of Turkey. *Vet Parasitol*, 187(3-4): 567-571.
12. Sen, E., Uchishima, Y., Okamoto, Y., Fukui, T., Kadosaka, T., Ohashi, N., Masuzawa, T. 2011. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks from Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of north-western Turkey. *Ticks Tick Borne Dis*, 2(2):94-98.
13. Ge, NL., Kocan, KM., Ewing, SA., Blouin, EF., Edwards, WL., Murphy, GL., Dawson, LJ. 1997. Use of a nonradioactive DNA probe for detection of *Anaplasma marginale* infection in field cattle: comparison with complement fixation serology and microscopic examination. *J Vet Diagn Invest*, 9(1):39-43.
14. Razmi, GR., Dastjerdi, K., Hossieni, H., Naghibi, A., Barati, F., Aslani, MR. 2006. An epidemiological study on *Anaplasma* infection in cattle, sheep, and goats in Mashhad Suburb, Khorasan Province, Iran. *Ann N Y Acad Sci*, 1078: 479-481.
15. Ziam, H., Benaouf, H. 2004. Prevalence of blood parasites in cattle from wilayates of Annaba and El Tarf east Algeria. *Arch Inst Pasteur Tunis*, 81(1-4):27-30.
16. El-Metenawy, TM. 2000. Prevalence of blood parasites among cattle at the central area of Saudi Arabia. *Vet Parasitol*, 87(2-3): 231-236.
17. Hornok, S., Elek, V., de la Fuente, J., Naranjo, V., Farkas, R., Majoros, G., Földvári, G. 2007. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *Vet Microbiol*, 122(3-4): 316-322.
18. Dreher, UM., Hofmann-Lehmann, R., Meli, ML., Regula, G., Cagienard, AY., Stärk, KD., Doherr, MG., Filli, F., Hässig, M., Braun, U., Kocan, KM., Lutz, H.

2005. Seroprevalence of anaplasmosis among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: no evidence of an emerging disease. *Vet Microbiol*, 107(1-2): 71-79.
19. Cringoli, G., Otranto, D., Testini, G., Buono, V., Di Giulio, G., Traversa, D., Lia, R., Rinaldi, L., Veneziano, V., Puccini, V. 2002. Epidemiology of bovine tick-borne diseases in southern Italy. *Vet Res*, 33(4):421-428.
 20. Baumgartner, W., Schlerka, G., Fumicz, M., Stöger, J., Awad-Masalmeh, M., Schuller, W., Weber, P. 1992. Seroprevalence survey for *Anaplasma marginale*-infection of Austrian cattle. *Zentralbl Veterinarmed B*, 39(2): 97-104.
 21. Rahman, WA., Fong, S., Chandrawathani, P., Nurulaini, R., Zaini, CM., Premalaatha, B. 2012. Comparative seroprevalences of bovine trypanosomiasis and anaplasmosis in five states of Malaysia. *Trop Biomed*, 29(1): 65-70.
 22. Alfredo, AA., Jonsson, NN., Finch, TM., Neves, L., Molloy, JB., Jorgensen, WK. 2005. Serological survey of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle in Tete Province, Mozambique. *Trop Anim Health Prod*, 37(2):121-131.
 23. Tembue, AA., da Silva, JB., da Silva, FJ., Pires, MS., Baldani, CD., Soares, CO., Massard, CL., da Fonseca, AH. 2011. Seroprevalence of IgG antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle from south Mozambique. *Rev Bras Parasitol Vet*, 20(4):318-324.
 24. Oliveira, JB., Montoya, J., Romero, JJ., Urbina, A., Soto-Barrientos, N., Melo, ES., Ramos, CA., Araújo, FR. 2011. Epidemiology of bovine anaplasmosis in dairy herds from Costa Rica. *Vet Parasitol*, 177(3-4): 359-365.
 25. Rodgers, SJ., Welsh, RD., Stebbins, ME. 1994. Seroprevalence of bovine anaplasmosis in Oklahoma from 1977 to 1991. *J Vet Diagn Invest*, 6(2):200-206.
 26. Taylor, SK., Lane, VM., Hunter, DL., Eyre, KG., Kaufman, S., Frye, S., Johnson, MR. 1997. Serologic survey for infectious pathogens in free-ranging American bison. *J Wildl Dis*, 33(2): 308-311.
 27. Hungerford, LL., Smith, RD. 1997. Variations in seroprevalence and host factors for bovine anaplasmosis in Illinois. *Vet Res Commun*, 21(1): 9-18.
 28. Coetzee, JF., Schmidt, PL., O'Connor, AM., Apley, MD. 2010. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in 2 Iowa feedlots and its association with morbidity, mortality, production parameters, and carcass traits. *Can Vet J*, 51(8): 862-868.
 29. Urdaz-Rodríguez, JH., Fosgate, GT., Alleman, AR., Rae, DO., Donovan, GA.,

- Melendez, P. 2009. Seroprevalence estimation and management factors associated with high herd seropositivity for *Anaplasma marginale* in commercial dairy farms of Puerto Rico. *Trop Anim Health Prod*, 41(7):1439-1448.
30. Fosgate, GT., Urdaz-Rodríguez, JH., Dunbar, MD., Rae, DO., Donovan, GA., Melendez, P., Dobek, GL., Alleman, AR. 2010. Diagnostic accuracy of methods for detecting *Anaplasma marginale* infection in lactating dairy cattle of Puerto Rico. *J Vet Diagn Invest*, 22(2):192-199.
 31. Barros, SL., Madruga, CR., Araújo, FR., Menk, CF., de Almeida, MA., Melo, EP., Kessler, RH. 2005. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100(6): 513-517.
 32. Guedes, DS Jr., Araújo, FR., Silva, FJ., Rangel, CP., Barbosa Neto, JD., Fonseca, AH. 2008. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the Northeastern region of the State of Pará, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 17(2):105-109.
 33. Teglas, M., Matern, E., Lein, S., Foley, P., Mahan, SM., Foley, J. 2005. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. *Vet Parasitol*, 131(1-2): 119-127.
 34. Cossío-Bayúgar, R., Rodríguez, SD., García-Ortiz, MA., García-Tapia, D., Aboytes-Torres, R. 1997. Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, Mexico. *Prev Vet Med*, 32(3-4): 165-170.
 35. Rodriguez, M., Penichet, ML., Mouris, AE., Labarta, V., Luaces, LL., Rubiera, R., Cordovés, C., Sánchez, PA., Ramos, E., Soto, A., Canales, M., Palenzuela, D., Triguero, A., Lleonart, R., Herrera, L., De la Fuente, J. 1995. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet Parasitol*, 57: 339-349.
 36. Carrique Mas, JJ., Widdowson, MA., Cuéllar, AM., Ribera, H., Walker, AR. 2000. Risk of babesiosis and anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz Department, Bolivia. *Vet Parasitol*, 93(1): 29-38.
 37. Reyna-Bello, A., Cloeckert, A., Vizcaíno, N., Gonzatti, MI., Aso, PM., Dubray,

- G., Zygmunt, MS. 1998. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clin Diagn Lab Immunol*, 5(2):259-262.
38. Alonso, M., Camus, E., Rodriguez Diego, J., Bertaudière, L., Tatareau, JC., Liabeuf, JM. 1992. Current status of bovine haemoparasitic diseases in Martinique (French West Indies). *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, 45(1): 9-14.
39. Payne, RC., Osorio, O. 1990. Tick-borne diseases of cattle in Paraguay. I. Seroepidemiological studies on anaplasmosis and babesiosis. *Trop Anim Health Prod*, 22(1): 53-60.
40. Maichomo, MW., Kosura, WO., Gathuma, JM., Gitau, GK., Ndung'u, JM., Nyamwaro, SO. 2009. Economic assessment of the performance of trypanotolerant cattle breeds in a pastoral production system in Kenya. *J S Afr Vet Assoc*, 80(3):157-162.
41. Dreyer, K., Fourie, LJ., Kok, DJ. 1998. Epidemiology of tick-borne diseases of cattle in Botshabelo and Thaba Nchu in the Free State Province. *Onderstepoort J Vet Res*, 65(4):285-289.
42. Mtshali, MS., De Waal, DT., Mbat, PA. 2004. A sero-epidemiological survey of blood parasites in cattle in the north-eastern Free State, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res*, 71(1): 67-75.
43. Marufu, MC., Chimonyo, M., Dzama, K., Mapiye, C. 2010. Seroprevalence of tick-borne diseases in communal cattle reared on sweet and sour rangelands in a semi-arid area of South Africa. *Vet J*, 184(1): 71-76.
44. Moyo, B., Masika, PJ. 2009. Tick control methods used by resource-limited farmers and the effect of ticks on cattle in rural areas of the Eastern Cape Province, South Africa. *Trop Anim Health Prod*, 41(4): 517-523.
45. Salih, DA., Abdel Rahman, MB., Mohammed, AS., Ahmed, R., Kamal, S., El Hussein, AM. 2009. Seroprevalence of tick-borne diseases among cattle in the Sudan. *Parasitol Res*, 104(4): 845-850.
46. Awad, H., Antunes, S., Galindo, RC., do Rosário, VE., de la Fuente, J., Domingos, A., El Hussein, AM. 2011. Prevalence and genetic diversity of *Babesia* and *Anaplasma* species in cattle in Sudan. *Vet Parasitol*, 181(2-4): 146-152.
47. Swai, ES., Karimuribo, ED., Ogden, NH., French, NP., Fitzpatrick, JL., Bryant,

- MJ., Kambarage, DM. 2005. Seroprevalence estimation and risk factors for *A. marginale* on smallholder dairy farms in Tanzania. *Trop Anim Health Prod*, 37(8): 599-610.
48. Jongejan, F., Perry, BD., Moorhouse, PD., Musisi, FL., Pegram, RG., Snacken, M. 1988. Epidemiology of bovine babesiosis and anaplasmosis in Zambia. *Trop Anim Health Prod*, 20(4): 234-242.
49. Singh, H., Jyoti Haque, M., Singh, NK., Rath, SS. 2012. Molecular detection of *Anaplasma marginale* infection in carrier cattle. *Ticks Tick Borne Dis*, 3(1):55-58.
50. Hornok, S., Micsutka, A., Fernández de Mera, IG., Meli, ML., Gönczi, E., Tánzos, B., Mangold, AJ., Farkas, R., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., de la Fuente, J. 2012. Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. *Res Vet Sci*, 92(1): 30-35.
51. Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P.J., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51: 2145-2165.
52. Aubry, P., Geale, DW. 2011. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis*, 58(1): 1-30.
53. <http://ahdc.vet.cornell.edu/clinpath/modules/rbcmorph/ANAPLAS.HTM>,
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Anaplasma-centrale.jpg>
54. Kocan, KM., De la Fuente, J., Blouin, EF. 2008. Characterization of the tick-pathogen-host interface of the tick-borne rickettsia *Anaplasma marginale*. Bowman AS, Nuttall PA. Eds. In: *Ticks Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press, pp. 325-343.
55. Marcelino, I., de Almeida, AM., Ventosa, M., Pruneau, L., Meyer, DF., Martinez, D., Lefrançois, T., Vachiéry, N., Coelho, AV. 2012. Tick-borne diseases in cattle: Applications of proteomics to develop new generation vaccines. *J Proteomics*, 75(14): 4232-4250.

56. Richey, EJ. 1999. Bovine anaplasmosis. College of Veterinary Medicine, University of Florida: (http://www.vetmed.ufl.edu/lacs/Richey/Anaplasmosis_99).
57. Richey, EJ., Palmer G. 1986. Anaplasmosis in beef cattle. Florida Cooperative Extension Service: (<http://hammock.ifas.ufl.edu>).
58. Sevinç, F. 2004. Sığırlarda Anaplasmosis. Erciyes Üniv Vet Fak Derg, 1(2) 113-118.
59. Whittier, D., Currin, N., Currin, JF. 2009. Anaplasmosis in Beef Cattle. Virginia Cooperative Extension, pp. 1-5.
60. Howden, KJ., Geale, DW., Paré, J., Golsteyn-Thomas, EJ., Gajadhar, AA. 2010. An update on bovine anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) in Canada. CVJ, 51: 837-840.
61. Massung RF, Lee K, Mauel MJ, Gusa A (2002): Characterization of the rRNA genes of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophila*. DNA and Cell Biology, 21, 587–596.
62. Dunning Hotopp JC, Lin M, Madupu R, Crabtree J, Angiuoli SV, Eisen J, Seshadri R, Ren Q, Wu M, Utterback TR, Smith S, Lewis M, Khouri H, Zhang C, Niu H, Lin Q, Ohashi N, Zhi N, Nelson W, Brinkac LM, Dodson RI, Rosovitz MJ, Sundaram J, Daugherty SC, Davidsen T, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Selengut JD, Sullivan SA, Zafar N, Zhou L, Benahmed F, Forberger H, Halpin R, Mulligan S, Robinson J, White O, Rikihisa Y, Tettelin H (2006): Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. PloS Genetics 2, 208–223.
63. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH (1994) Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. Journal of Clinical Microbiology 32, 589–595
64. Bakken JS, Haller I, Riddell D, Walls JJ, Dumler JS (2002): The serological response of patients with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. Clinical Infectious Diseases 34, 22–27.
65. Comer JS, Nicholson WL, Sumner JW, Olson JG, Childs JE (1999): Diagnosis of human ehrlichiosis by PCR assay of acute-phase serum. Journal of Clinical Microbiology 37, 31–34.
66. Petrovec M, Lotric Furlan S, Zupanc TA, Strle F, Brouqui Ph, Roux V, Dumler

- JS (1997): Human disease in Europe caused by a granulocytic Ehrlichia species. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 1556–1559.
67. Goodman JL, Nelson C, Vitale B, Madigan JE, Dumler JS, Kurtti TJ, Munderloh UG (1996): Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *The New England Journal of Medicine* 334, 210–215.
 68. Massung RF, Levin ML, Munderloh UG, Silverman DJ, Lynch MJ, Gaywee JK, Kurtti TJ (2007): Isolation and propagation of the Ap-variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum* in a tick cell line. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 2138–2143.
 69. Warner CK, Dawson JE (1996): Genus- and species-level identification of Ehrlichia species by PCR and sequencing. In: Persing DH (ed.): *PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases*. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 101–105.
 70. Petrovec M, Sumner JW, Nicholson WL, Childs JE, Strle F, Barlic J, Lotric-Furlan S, Avsic-Zupanc T (1999): Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 209–210.
 71. Petrovec M, Sixl W, Marth E, Bushati N, Wust G (2003): Domestic animals as indicators of *Anaplasma* species infections in Northern Albania. *Annals of the New York Academy of Sciences* 990, 112–115.
 72. Stefancikova A, Derdakova M, Lencakova D, Ivanova R, Stanko M, Cislakova L, Petko B (2008): Serological and molecular detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasmataceae* in rodents. *Folia Microbiologica (Praha)* 53, 493–499.
 73. Kocan, KM., de la Fuente, J., Guglielmone, AA., Meléndez, RD. 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbiol Rev*, 16(4): 698-712.
 74. Brayton, KA., Kappmeyer, LS., Herndon, DR., Dark, MJ., Tibbals, DL., Palmer, GH., McGuire, TC., Knowles, DP Jr. 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(3): 844-849.
 75. Lopez, JE., Palmer, GH., Brayton, KA., Dark, MJ., Leach, SE., Brown, WC.

2007. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. *Infect Immun*, 75(5):2333-2342.
76. Herndon, DR., Palmer, GH., Shkap, V., Knowles, DP Jr., Brayton, KA. 2010. Complete genome sequence of *Anaplasma marginale* subsp. *Centrale*. *J Bacteriol*, 192(1): 379-380.
 77. Barbet AF, Meeus PFM, Belanger M, Bowie MV, Yi J, Lundgren AM, Alleman AR, Wong SJ, Chu FK, Munderloh UG, Jauron SD (2003): Expression of multiple outer membrane protein sequence variants from a single genomic locus of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and Immunity* 71, 1706–1718.
 78. Barbet AF, Lundgren AM, Alleman AR, Sten S, Bjoersdorff A, Brown RN, Drazenovich NL, Foley JE (2006): Structure of the site reveals global diversity in MSP2 (P44) variants in *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and Immunity* 74, 6429–6437.
 79. Caturegli P, Asanovich KM, Walls JJ, Bakken JS, Madigan JE, Popov VL, Dumler JS (2000): ankA: an *Ehrlichia phagocytophila* group gene encoding a cytoplasmic protein antigen with ankyrin repeats. *Infection and Immunity* 68, 5277–5283.
 80. Walls JJ, Caturegli P, Bakken JS, Asanovich KM, Dumler JS (2000): Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis using epank1 genes of *Ehrlichia phagocytophila*-group *ehrlichiae*. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 354–356.
 81. Yang J, Liu Z, Niu Q, Liu J, Xie J, Chen Q, Chen Z, Guan G, Liu G, Luo J, Yin H. Evaluation of different nested PCRs for detection of *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants and ticks. *BMC Vet Res*. 2016 Feb 24;12(1):35.
 82. Storey JR, Doros-Richert LA, Gingrich-Baker C, Munroe K, Mather TN, Coughlin RT, Beltz GA, Murphy CI. Molecular cloning and sequencing of three granulocytic *Ehrlichia* genes encoding high-molecular-weight immunoreactive proteins. *Infect Immun*. 1998 Apr;66(4):1356-63.
 83. Yaxue Z, Hongtao J, Qiuyue W, Zhixin F, Hongwei G, Pengpeng L, Quan L, Lifeng C. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Ixodid ticks in Hebei Province, China. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011 Oct;11(10):1323-7.
 84. <http://icwdm.org/PDF's/anaplasmosisTXA&M.pdf>

85. Kocan, KM., Blouin, EF., Barbet, AF. 2000. Anaplasmosis control. Past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci*, 916: 501-509.
86. Estrada-Pena, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R. 2004. *Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region*, 1th ed. University of Zaragoza, Spain.
87. Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol*. 2004 Jul;42(7):3164-8.
88. Kawahara M, Rikihisa Y, Lin Q, Isogai E, Tahara K, Itagaki A, Hiramitsu Y, Tajima T. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Feb;72(2):1102-9.
89. Drummond AJ, Ashton B, Buxton S. Geneious" v5.5, <http://www.geneious.com>, 2011.
90. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
91. Richter D, Matuschka FR. "Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*," *Anaplasma phagocytophilum*, and lyme disease spirochetes in questing european vector ticks and in feeding ticks removed from people. *J Clin Microbiol*. 2012 Mar;50(3):943-7.
92. Hildebrandt A, Krämer A, Sachse S, Straube E. Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). *Ticks Tick Borne Dis*. 2010 Mar;1(1):52-6.
93. Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. 2012. Ticks and tick-borne diseases: A one health perspective. *Trends Parasitol*, 28: 437-446.
94. Ergunay K, Saygan MB, Aydogan S, Litzba N, Sener B, Lederer S, Niedrig M, Hascelik G, Us D. 2011. Confirmed exposure to tick-borne encephalitis virus and probable human cases of tick-borne encephalitis in Central/Northern Anatolia, Turkey. *Zoonoses Public Health*, 58:220-227.
95. Ergunay K, Ozer N, Us D, Ozkul A, Simsek F, Kaynas S. 2007. Seroprevalence of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in southeastern Turkey: first evidence for tick-borne encephalitis virus infections. *Vector Borne Zoonotic*

- Dis, 7: 157-161.
96. Arslan ÖM. Türkiye’de hayvanlarda kene enfestasyonları ve kenelerin bulaştırdığı hastalıkların durumu. 14. Ulusal Parazitoloji Kongresi, (YM02-04), 2005, İzmir.
 97. Aydın L, Bakırcı S. Geographical distribution of ticks in Turkey. *Parasitol Res* 2007;101: 163-166.
 98. Dumanlı N, Altay K, Aydın MF. Türkiye’de sığır, koyun ve keçilerde belirlenen kene türleri. *Türkiye Klinikleri Vet Bil Derg* 2012; 3(2): 67-72.
 99. Karaer Z, Yukarı BA, Aydın L. Türkiye Keneleri ve Vektörlükleri. In: Özcel MA, Daldal N. (Editörler). *Parazitolojide Artropod Hastalıkları ve Vektörler*. Türkiye Parazitoloji Derneği, 1997: 363-433.
 100. Stuen S. Tick-borne infections in small ruminants in northern Europe. *Small Rum Res* 2013; 110: 142-144.
 101. Aktas M. A survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens. *Vet Parasitol* 2014; 200 (3-4): 276-783.
 102. Hoşgör M, Bilgiç HB, Bakırcı S, Ünlü AH, Karagenç T, Eren H. Detection of Anaplasma / Ehrlichia Species of Cattle and Ticks in Aydın Region. *Türkiye Parazitol Derg.* 2015 Dec;39(4):291-8.
 103. Karagenç T, Bilgiç HB, Hoşgör M, Aysul N, Aypak S, Eren H, (2005) Aydın Yöresi Sığırlarında RLB Tekniği Kullanılarak Theileria, Babesia, Anaplasma, Ehrlichia Türlerinin Belirlenmesi. XIV. Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı, 262-263.
 104. Sevinç F, Derinbay Ö, (2005) Bir Sığırcılık İşletmesinde Anaplasmosis Problemi. XIV. Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı, 133–134.
 105. Çakmak A, (1990) Ankara Yöresinde Bir Sığır Sürüsünde Hemoparazitlerin İnsidansının Araştırılması. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 37(3): 632-645.
 106. Gökçe HA, Genç O, Akça A, Vatansever Z, Unver A, Erdoğan HM, (2008) Molecular ve Serological Evidence of Anaplasma phagocytophilum Infection of Farm Animals in The Black Sea Region of Turkey. *Acta Vet. Hung.*, 56(3): 281–292.
 107. Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S. O., Hassler, D., Kimmig, P., 2004. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of Anaplasma phagocytophilum (Ehrlichia sp.), Wolbachia sp., Rickettsia sp., and Babesia sp.

- in Southern Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* 37: 86-92.
108. Leonhard, S., 2005. Untersuchungen zu Häufigkeit von *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* und *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* aus Bayern und Baden-Württemberg [Dissertation]. Ludwig-Maximilians-University, München, Germany.
 109. Oehme, R., Hartelt, K., Backe, H., Brockmann, S., Kimmig, P., 2002. Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* 291 Suppl. 33, 22-29.
 110. Ferquel, E., Garnier, M., Marie, J., Bernède-Bauduin, C., Baranton, G., Pérez-Eid, C., Postic, D., 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma* spp. members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3074-3078.
 111. Halos, L., Vourc'h, G., Cotte, V., Gasqui, P., Barnouin, J., Boulous, H. J., Vayssier-Taussat, M., 2006. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* sp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in Questing *Ixodes ricinus* Ticks from France. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 316-319.
 112. Cinco, M., Padovan, D., Murgia, R., Maroli, M., Frusteri, L., Heldtander, M., Johansson, K. E., Engvall, E. O., 1997. Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 35, 3365-3366.
 113. Mantelli, B., Pecchioli, E., Hauffe, H. C., Rosà, R., Rizzoli, A., 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Anaplasma phagocytophilum* in the wood tick *Ixodes ricinus* in the Province of Trento, Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25, 737-739.
 114. Piccolin, G., Benedetti, G., Doglioni, C., Lorenzato, C., Mancuso, S., Papa, N., Pitton, L., Ramon, M. C., Zasio, C., Bertiato, G., 2006. A Study of the Presence of *B. burgdorferi*, *Anaplasma* (Previously *Ehrlichia*) *phagocytophilum*, *Rickettsia*, and *Babesia* in *Ixodes ricinus* Collected within the Territory of Belluno, Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6, 24-31.
 115. Alberdi, M. P., Walker, A. R., Paxton, E. A., Sumption, K. J., 1998. Natural prevalence of infection with *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila* of *Ixodes ricinus* ticks in Scotland. *Vet. Parasitol.* 78, 203-213.

116. Mäkinen, J., Vuorinen, I., Oksi, J., Peltomaa, M., He, Q., Marjamäki, M., Viljanen, M.-K., 2003. Prevalence of granulocytic Ehrlichia and Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus ticks collected from southwestern Finland and from Vormsi Island in Estonia. APMIS. 111, 355-362.
117. Polin, H., Hufnagl, P., Haunschmid, R., Gruber, F., Ladurner, G., 2004. Molecular Evidence of Anaplasma phagocytophilum in Ixodes ricinus Ticks and Wild Animals in Austria. J. Clin. Microbiol. 42, 2285-2286.
118. Sixl, W., Petrovec, M., Marth, E., Wüst, G., Stünzer, D., Schweiger, R., Avsic-Zupanc, T., 2003. Investigation of Anaplasma phagocytophila Infections in Ixodes ricinus and Dermacentor reticulatus ticks in Austria. Ann. N. Y. Acad. Sci. 990, 94-97.
119. Pusterla, N., Leutenegger, C. M., Huder, J. B., Weber, R., Braun, U., Lutz, H., 1999b. Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in Ixodes ricinus ticks in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 37, 1332-1334.
120. Liz, J. S., Anderes, L., Sumner, J. W., Massung, R. F., Gern, L., Rutti, B., Brossard, M., 2000. PCR Detection of granulocytic ehrlichiae in Ixodes ricinus ticks and wild small mammals in Western Switzerland. J. Clin. Microbiol. 38, 1002-1007.
121. Leutenegger, C. M., Pusterla, N., Mislin, C. N., Weber, R., Lutz, H., 1999. Molecular evidence of coinfection of ticks with Borrelia burgdorferi sensu lato and the human granulocytic ehrlichiosis agent in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 37, 3390-3391.
122. Skarphéðinsson, S., Jensen, P. M., Kristiansen, K., 2005. Survey of Tickborne Infections in Denmark. Emerg. Inf. Dis. 11, 1055-1061.
123. Derdáková, M., Halanova, M., Stanko, M., Stefancikova, A., Cislakova, L., Pet'ko, B., 2003. Molecular evidence for Anaplasma phagocytophilum and Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus ticks from eastern Slovakia. Ann. Agric. Environ. Med. 10, 269-271.
124. Hulínská, D., Langrová, K., Pejcoch, M., Pavlásek, I., 2004. Detection of Anaplasma phagocytophilum in animals by real-time polymerase chain reaction. APMIS 112, 239-247.
125. Stańczak, J., Gabre, R. M., Kruminis-Lozowska, W., Racewicz, M., Kubica-Biernat, B., 2004. Ixodes ricinus as a vector of Borrelia burgdorferi sensu lato,

Anaplasma phagocytophilum and *Babesia microti* in urban and suburban forests. Ann. Agric. Environ. Med. 11, 109-114.

- 126.** Koči, J., Movila, A., Taragel'ová, V., Toderas, I., Uspenskaia, I., Derdáková, M., Labuda, M., 2007. First report of *Anaplasma phagocytophilum* and its co-infections with *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) from Republic of Moldova. Exp. Appl. Acarol. 41, 147-152.
- 127.** Noaman V, Shayan P, (2010) A new PCR-RFLP method for detection of *Anaplasma marginale* based on 16S rRNA. Vet. Res. Commun, 34: 43–50.
- 128.** Noaman V, Shayan P, (2010) Molecular Detection of *Anaplasma bovis* in Cattle from Central Part of Iran. Vet. Res., 1(2):117-122.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Ömer TÜRKMEN

Uyruğu: (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 12.04.1987, Kayseri

Medeni Durumu: Bekar

Tel: +90 5553181848

e-mail: omerturkmen87@gmail.com

Yazışma Adresi: ERU Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı/
KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniv. Veteriner Fakültesi	2012
Lise	Hacı Ahmet Arısoy Lisesi	2005

YABANCI DİL

İngilizce, Orta