T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

SIĞIRLARDA *OSTERTAGIA OSTERTAGI* VE *HAEMONCHUS* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER PREVALANSI, KARAKTERİZASYONU VE BENZİMİDAZOL DİRENÇLİLİĞİNİN MOLEKÜLER OLARAK ARAŞTIRILMASI

Proje No: TSA-2015-5777

Proje Türü
Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Önder DÜZLÜ
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Abdullah İNCİ
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Zuhal ÖNDER
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı
Araş. Gör. Dr. Arif ÇİLOĞLU
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Nisan 2017
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Araştırıcılar bu çalışmaya TSA-2015-5777 kodlu proje ile finansman desteği veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederler.

İÇİNDEKİLER

KAPAK ..... **i**

TEŞEKKÜR ..... **ii**

İÇİNDEKİLER ..... **iii**

TABLO LİSTESİ ..... **vi**

ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**

ÖZET ..... **x**

ABSTRACT xii

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM **1**

2. LİTERATÜR BİLGİ **3**

2.1 SIĞIRLARDA OSTERTAGİOSİS 3

2.1.1 *Ostertagia ostertagi*'nin Sınıflandırmadaki Yeri 3

2.1.2 *Ostertagia ostertagi*'nin Morfolojisi 4

2.1.3 *Ostertagia ostertagi*'nin Yaşam Döngüsü 4

2.1.4 *Ostertagia ostertagi*'nin Epidemiyolojisi 5

2.1.5 *Ostertagia ostertagi*'nin Patojenitesi 5

2.1.6 *Ostertagia ostertagi* Enfeksiyonlarında Klinik Belirtiler 7

2.1.7 Ostertagiosis'in Tanısı 8

2.1.8 Ostertagiosis'in Tedavisi 8

2.1.9 Ostertagiosis'te Korunma ve Kontrol 8

2.2 SIĞIRLARDA HAEMONCHOSİS 9

2.2.1 *Haemonchus* Türlerinin Sınıflandırmadaki Yeri 9

2.2.2 *Haemonchus* Türlerinin Morfolojisi 10

2.2.3 *Haemonchus* Türlerinin Biyolojisi 10

2.2.4 *Haemonchus* Türlerinin Epidemiyolojisi 11

2.2.5 Haemonchosis'in Patogenezi 12

2.2.6 Haemonchosis'te Tanı 14

2.2.7 Haemonchosis'te Tedavi 17

2.2.8 Antihelmintik Dirençliliği 20

2.2.9 Antihelmintik Dirençliliğinin Belirlenmesi 23

2.2.10 Korunma ve Kontrol 27

3. GEREÇ VE YÖNTEM 28

3.1 Araştırma Sahası ve Sığır Dışkı Örnekleri 28

3.2 Konvansiyonel Dışkı Muayenesi 28

3.3 Gram Dışkıdaki Yumurta Sayısının (EPG) Belirlenmesi 29

3.5.1 Yumurta İzolasyonu 30

3.5.2 Larva İzolasyonu 30

3.5.3 Genomik DNA İzolasyonu 31

3.8.1 Yumurta ve Larva Süspansiyonlarından Elde Edilmiş Genomik DNA'larda Sybergreen Real Time PCR ile *O. ostertagia* ve *H. contortus* Pozitif İzolatların Belirlenmesi 33

3.8.2 *O. ostertagia* ve *H. contortus* Pozitif İzolatlarda Mt-COI Geninin Amplifikasyonu ve Pürifikasyonu 33

3.8.3 Mt-COI Gen Bölgelesinin Klonlanması ve Plazmid DNA İzolasyonu 34

3.10.1 Beta Tubulin İzotip-1 Geni Tek Nükleotid Polimorfizminin (SNP) Real Time PCR ile Araştırılması ve Allel Sıklıklarının Belirlenmesi 37

3.10.2 β tubulin izotip-1 Geninin Amplifikasyonu, Klonlama ve Sekans Analizleri 39

4. BULGULAR 41

4.1 Konvansiyonel Dışkı Muayenesi ve Larva Kültürü Sonuçları 41

4.2 Gram Dışkıdaki Yumurta Sayısı (EPG) ve İstatistiksel Analizi 48

4.3 Mt-COI Geninin Amplifikasyonu 58

4.4 Sybergreen Real Time PCR Sensitivite ve Spesifite Analiz Sonuçları 58

4.5 Sybergreen Real Time PCR ile Trichostrongylid Yumurta Pozitif İzolatlarda *O. ostertagi* ve *H. contortus* Pozitiflikleri, Moleküler Prevalans ve İstatistiksel Analiz Sonuçları 62

4.6 Mt-COI Gen Bölgesinin Sekans Analizi Sonuçları 68

4.7 Mt-COI Gen Bölgesinin Filogenetik Analiz Sonuçları..... 72

4.8 *H. contortus* Popülasyonlarında Benzimidazol Dirençliliği Sonuçları 74

4.8.1 Beta Tubulin İzotip-1 Geni Tek Nükleotid Polimorfizminin (SNP) Real Time PCR ile Analiz sonuçları ve Allel Sıklıkları 74

4.8.2 β tubulin izotip-1 Geninin Amplifikasyon ve Sekans Analiz Sonuçları 76

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 79

6. KAYNAKLAR 96

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 İç Anadolu yöresinde örneklenen sığırların yaş, cinsiyet ve ırklarına göre dağılımları 28

Tablo 3.2 *O. ostertagi* ve *H. contortus* mt-COI gen bölgesinden dizayn edilen Sybergreen Real Time PCR primerleri ve özellikleri 32

Tablo 3.3 *H. contortus*'un β tubulin izotip-1 gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizminin tespiti için Real Time PCR'da kullanılan primerler 38

Tablo 4.1 Araştırma illerinde Trichostrongylid yumurtaları ile pozitif belirlenen sığırların yaş ve cinsiyet özelliklerine göre dağılımları 42

Tablo 4.2 Araştırma illerinde Trichostrongylid yumurtaları ile pozitif belirlenen sığırların ırk ve dışkı karakterlerine göre dağılımları 43

Tablo 4.3 Yaş gruplarına göre Trichostronylid pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)..... 45

Tablo 4.4 Sığırların cinsiyetine göre Trichostronylid pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20) 46

Tablo 4.5 Sığırların ırkına göre Trichostronylid pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20).... 47

Tablo 4.6 Dışkı karakterine göre Trichostronylid pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20).. 48

Tablo 4.7 Trichostronylid yumurtaları ile pozitif belirlenen sığırlarda EPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımı 48

Tablo 4.8 Sığırlarda EPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımının istatistiksel analizi..... 50

Tablo 4.9 Trichostronylid yumurtaları ile pozitif belirlenen sığırlarda EPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımı 51

Tablo 4.10 Sığırlarda EPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımının istatistiksel analizi 52

Tablo 4.11 Trichostronylid yumurtaları ile pozitif belirlenen sığırlarda EPG değerlerinin ırka göre dağılımı..... 52

Tablo 4.12 Sığırlarda EPG değerlerinin ırka göre dağılımının istatistiksel analizi 55

Tablo 4.13 Trichostronylid yumurtaları ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımı 56

Tablo 4.14 Sığırlarda EPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımının istatistiksel analizi 58

Tablo 4.15 Trichostrongylid yumurtaları ile pozitif saptanan örneklere ait genomik DNA izolatlarının *O. ostertagi* ve *H. contortus* türleri yönünden sybergreen Real Time PCR sonuçları 62

Tablo 4.16 Araştırma merkezlerine göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansı..... 63

Tablo 4.17 Yaş gruplarına göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansı..... 63

Tablo 4.18 Yaş gruplarına göre *O. ostertagia* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)..... 64

Tablo 4.19 Yaş gruplarına göre *H. contortus* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)..... 64

Tablo 4.20 Cinsiyete göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansı 64

Tablo 4.21 Cinsiyetine göre *O. ostertagia* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20) 65

Tablo 4.22 Cinsiyetine göre *H. contortus* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20) 65

Tablo 4.23 Irka göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansı 66

Tablo 4.24 Irka göre *O. ostertagia* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20) 66

Tablo 4.25 Irka göre *H. contortus* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20) 66

Tablo 4.26 Dışkı karakterine göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansı 67

Tablo 4.27 Dışkı karakterine göre *O. ostertagia* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20) ... 67

Tablo 4.28 Dışkı karakterine göre *H. contortus* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20) 67

Tablo 4.29 Klonlama ve plazmid pürifikasyonuna tabii tutulan genomik DNA izolatları 69

Tablo 4.30 *O. ostertagia ve H. contortus* izolatlarının mt-COI sekanslarının ikili hizalama farklılıkları 71

Tablo 4.31 Benzimidazol duyarlı ve dirençli allel sıklıklarının istatistiksel analizi 75

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1 pJET1.2/blunt cloning vector haritası 35

Şekil 3.2 LB katı besi yerinde üreyen koloniler 35

Şekil 3.3 Kolonilerin LB sıvı besi yerinde üretilmesi 36

Şekil 4.1 Dışkı örneklerinde Trichostrongylid yumurtaları ve kültür sonucu belirlenen larva 41

Şekil 4.2 Örnekleme merkezlerine göre sığırlarda Trichostrongylid enfeksiyonlarının dağılımı 44

Şekil 4.3 Sığırların yaş gruplarına göre Trichostrongylid enfeksiyonlarının dağılımı 44

Şekil 4.4 Sığırların cinsiyetine göre Trichostronylid pozitifliğinin dağılımı 45

Şekil 4.5 Sığırların ırkına göre Trichostronylid pozitifliğinin dağılımı 46

Şekil 4.6 Sığırlarda dışkı karakterine göre Trichostronylid pozitifliğinin dağılımı 47

Şekil 4.7 EPG değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği 50

Şekil 4.8 OPG değerlerinin sığırların cinsiyetine göre dağılım grafiği 51

Şekil 4.9 EPG değerlerinin sığırların ırkına göre dağılım grafiği 54

Şekil 4.10 EPG değerlerinin sığırların dışkı karakterlerine göre dağılım grafiği 57

Şekil 4.11 İzolatların mt-COI gen bölgesi spesifik primerlerle nested PCR sonucu amplifikasyonu 58

Şekil 4.12 *O. ostertagi* mt-COI gen bölgesinden dizayn edilen primer çiftinin bağlanma spesifiteleri ve özellikleri 59

Şekil 4.13 *H. contortus* mt-COI gen bölgesinden dizayn edilen primer çiftinin bağlanma spesifiteleri ve özellikleri 59

Şekil 4.14 *O. ostertagi* izolatlarına ait hedef mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerlerle sybergreen Real Time PCR'da belirlenen amplifikasyon eğrileri. 60

Şekil 4.15 *H. contortus* izolatlarına ait hedef mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerlerle sybergreen Real Time PCR'da belirlenen amplifikasyon eğrileri. 60

Şekil 4.16 *O. ostertagi* izolatlarına ait hedef mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerlerle sybergreen Real Time PCR'da melting curve analizleri ile belirlenen spesifik erime noktaları 60

Şekil 4.17 *H. contortus* izolatlarına ait hedef mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerlerle sybergreen Real Time PCR'da melting curve analizleri ile belirlenen spesifik erime noktaları 61

Şekil 4.18 *O. ostertagi* ve *H. contortus* için linearize plazmidler kullanılarak oluşturulan standart eğriler ve etkinlik oranları. 61

Şekil 4.19 Trichostrongylid yumurtaları ile pozitif saptanan örneklerde belirlenen *O. ostertagi* ve *H. contortus* türlerinin incelenen sığır sayısına göre dağılım grafiği 62

Şekil 4.20 Bazı plazmidlerde hedef insert genlerin vektör spesifik primerlerle PCR analizleri sonucu belirlenen amplikonlar 68

Şekil 4.21 *O. ostertagia ve H. contortus* türlerine ait izolatların mt-COI nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları 70

Şekil 4.22 *O. ostertagi* ve *H. contortus* izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) analizine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen izolatlar kırmızı ve kalın karakterde yerleştikleri cluster kırmızı renkte gösterilmiştir. Node'ların önündeki rakamlar Bayesian posterior olasılığını göstermektedir. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir. 73

Şekil 4.23 TaqMan prob Real Time PCR analizleri sonucu *H. contortus* duyarlı allellerin amplifikasyon eğrileri 74

Şekil 4.24 TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizleri sonucu *H. contortus* dirençli allellerin amplifikasyon eğrileri 75

Şekil 4.25 Araştırma yöresinde benzimidazol duyarlı ve dirençli *H. contortus* nesillerinin allel sıklıklarına göre dağılımı. 76

Şekil 4.26 *H. contortus* izolatlarının β tubulin izotip-1 gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 1-3: Duyarlı allel sıklığı %100 belirlenen izolatlara ait amplikonlar; 4-6: Dirençli allel sıklığı >50 belirlenen izolatlara ait amplikonlar . 77

ÖZET

Bu çalışma, İç Anadolu Bölgesi'ndeki sığırlarda *Ostertagia ostertagi* ve *Haemonchus* türlerinin moleküler prevalansı ve karakterizasyonu ile benzimidazol dirençliliğinin moleküler olarak araştırılması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla 2013-2015 yılları arasında Kayseri, Nevşehir, Yozgat ve Kırşehir illerindeki halk elinde yetiştiriciliği yapılan çeşitli sığırcılık işletmelerindeki farklı yaş, cinsiyet ve ırklara ait toplam 920 baş sığırdan tekniğine uygun olarak dışkı örneği toplanmıştır. Konvansiyonel dışkı muayenesi sonucunda, incelemesi yapılan toplam 920 sığırın 210'u (%22,8) Trichostrongylid yumurtaları yönünden pozitif bulunmuştur. Trichostrongylid yumurtaları ile pozitiflik en yüksek %25,4 ile Kayseri yöresinden örneklenen sığırlarda belirlenmiş bunu sırasıyla %22,1, %21,0 ve %20,5 ile Yozgat, Nevşehir ve Kırşehir yörelerinden örneklenen sığırlar izlemiştir. Trichostronylid yumurtaları ile pozitif belirlenen 210 sığırda ortalama EPG değeri 460,1±34,0 (min:50,00, max:1000,00) belirlenmiştir. Gerek Trichostrongylid yumurtaların dağılımı gerekse EPG düzeyleri temelinde istatistiksel açıdan cinsiyet ve ırka göre farklılık tespit edilmemiş olup ($p>0,05$), yaş ve dışkı karakteri açısından farklılık önemli bulunmuştur ($p<0,001$). Yumurta pozitif örnekler EPG sayıları temelinde 3. dönem enfektif larvaların elde edilmesi için kültüre edilmiştir. Trichostrongylid yumurta ve larva (L3) süspansiyonlarından izole edilen genomik DNA'ların mt-COI genini parsiyel olarak amplifiye eden genel primerlerle nested PCR analizleri konfirmasyon amacıyla gerçekleştirilmiştir. Mt-COI gen bölgesi analizleri temelinde pozitif belirlenen izolatlarda bu bölgeden dizayn edilen primerlerle sybergreen real time PCR analizleri yapılmıştır. Melting curve analizlerinde ayrıca *O. ostertagi* ve *H. contortus* için erime sıcaklıkları spesifik olarak sırasıyla 80,0°C ve 75,0°C belirlenmiştir. Sybergreen real time PCR ile analiz sonuçlarında Trichostrongylid yumurta pozitif 210 örneğin 34'ünde *O. ostertagi,* 58'inde *H. contortus* ve 23'ünde her iki türle miks enfeksiyon pozitifliği belirlenmiş ve incelenen toplam 920 sığır örneği bazında iki tür için moleküler prevalans oranları sırasıyla %6,2 ve %8,8 olarak saptanmıştır. Pozitif izolatlardan klonlama ve plazmid pürifikasyonu sonrası *O. ostertagia* ve *H. contortus* türlerine ait mt-COI gen bölgesinin 402 bp kısmını içeren toplam 14 sekans başarıyla elde edilmiştir. GenBank kayıtları (KY678201-KY678214) yapılan izolatların dünyadaki benzer izolatlar ile çoklu hizalamaları yapılarak filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Filogenetik analizlere göre çalışmamızda karakterize edilen *H. contortus* izolatları filogenetik ağaçta Kayseri yöresinde koyunlardan izole edilen izolatlarla daha yakın bulunmuş (genetik farklılık %1,1±0,5) ve

birlikte cluster oluşturmuştur. Karakterize edilen bu izolatlar ayrıca Pakistan ve Brezilya'dan bildirilen izolatlarla sırasıyla %3,4±1,0 ve %5,7±1,1 farklılık göstermiştir. Türkiye'den ilk kez izole ve karakterize ettiğimiz *O. ostertagia* izolatları ayrı bir grup oluşturmuş ve bu grup içinde iki cluster'da yerleşim göstermiştir. Çalışmada belirlenen bu izolatlar ayrıca GenBank'ta yalnızca Japonya'dan mevcut olan homolog izolatlarla %4,3±0,9 genetik farklılık göstermiştir. Çalışmada saptanan izolatların soy bazında genetik analizlerinde *H. contortus* izolatlarının %17,1±2,6, %18,3±2,6, %18,7±2,8, %20,7±3,0, %22,0±3,3 ve %24,6±3,6 genetik farklılıklarla sırasıyla *Cooperia oncophora, Mecistocirrus digitatus, Trichostrongylus axei, O. ostertagi, Teladorsagia circumcincta* ve *Nematodirus spathiger* türlerine filogenetik olarak yakın olduğu belirlenmiştir. *O. ostertagia* izolatlarının ise %15,2±2,3, %15,8±2,4, %16,3±2,6, %17,3±2,6, %19,8±3,0 ve %20,7±3,0 genetik farklılıklarla sırasıyla *T. circumcincta, Tr. axei, C. oncophora, N. spathiger, M digitatus* ve *H. contortus* türlerine filogenetik olarak yakın olduğu saptanmıştır. Çalışmada ayrıca duyarlı ve dirençli allel sıklıklarına göre belirlenen bazı izolatlarda β tubulin izotip-1 gen bölgesinin sekansları belirlenmiş ve benzimidazol dirençliliği açısından tek nükleotid polimorfizmleri araştırılmıştır. Duyarlı allele ait izolatların hiçbirinde polimorfizm görülmezken dirençli allele ait iki izolatın β tubulin izotip-1 gen bölgesinin 200. kodonunda tek nükleotid polimorfizmi gösterdiği ve fenilalanin (TTC) amino asidinin tirozin amino asitine (TAC) dönüştüğü saptanmıştır.

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

Anahtar kelimeler: Benzimidazol dirençliliği, *Haemonchus contortus*, moleküler karakterizasyon, *Ostertagia ostertagi*, real time PCR, sığır

MOLECULAR PREVALANCE AND CHARACTERIZATION OF *OSTERTAGIA OSTERTAGI* AND *HAEMONCHUS* SPECIES IN CATTLE, AND MOLECULAR INVESTIGATION OF BENZIMIDAZOLE RESISTANCE

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the molecular prevalence and characterization of *Ostertagia ostertagi* and *Haemonchus* species and as well as benzimidazole resistance in *H. contortus* populations in cattle from the Central Anatolia Region. For this aim, between 2013 and 2015 fecal samples were techniqually collected from totally 920 cattle in different age, gender and races from Kayseri, Nevsehir, Yozgat, and Kırsehir districts. 210 (22.8%) out of examined cattle were found to be positive with Trichostrongylid eggs. Trichostronglids were found to be the most prevalent species with the ratio of 25.4% in Kayseri region, and this ratio was followed by Yozgat, Nevsehir and Kırsehir regions with the ratios 22.1%, 21.0%, and 20.5%, respectively. The mean egg per gram of feces (EPG) value in 210 cattle infected with trichostrongylids was determined as 460.1±34.0 (min:50.00, max:1000.00). On the basis of Trichostrongylid eggs and EPG levels, no difference was detected in gender and race ($p>0.05$), and the difference in age and fecal character was found significant ($p<0.001$) statistically. Egg-positive specimens were cultured on the basis of EPG counts to obtain infectious 3. stage larvae. Nested PCR analyzes were performed with general primers that partially amplify the mt-COI gene of genomic DNA isolated from the suspensions of Trichostrongylid eggs and larvae (L3). Based on the Mt-COI gene region analyzes, sybergreen real time PCR analyzes was performed in the positive isolates with the primers designed in this gene region. In melting curve analysis, melting temperatures for *O. ostertagi* and *H. contortus* were also determined specifically at 80.0°C and 75.0°C. In sybergreen real time PCR analysis, Trichostrongylid egg positive 210 samples were identified as *O. ostertagi* in 34, as *H. contortus* in 58 and as mix with both species in 23, and the molecular prevalence rates for *O. ostertagi* and *H. contortus* were found as 6.2% and 8.8%. After cloning from positive isolates and plasmid purification, a total of 14 sequences containing 402 bp of the mt-COI gene region of *O. ostertagia* and *H. contortus* species were successfully obtained. The phylogenetic analyses of the isolates recorded in GenBank (KY678201-KY678214) were carried out by multiple alignments of the isolates with the similar ones available in GenBank in the world. According to phylogenetic analysis, the isolates of H.contortus which were characterized in our study were found to be closer to the isolates isolated from the sheep in

Kayseri region (genetic difference 1.1% ± 0.5) and clustered together in the phylogenetic tree. These isolates also differed by 3.4%±1.0 and 5.7%±1.1, respectively, with isolates from Pakistan and Brazil. *O. ostertagia* isolates isolated and characterized for the first time from Turkey have formed a separate group and have been located in two clusters within this group. These isolates identified in the study also showed genetic differences of 4.3%±0.9 in GenBank with only homologous isolates from Japan. *H. contortus* isolates were phylogenetically close to *Cooperia oncophora, Mecistocirrus digitatus, Trichostrongylus axei, O. ostertagi, Teladorsagia circumcincta and Nematodirus spathiger* with the ratios 17.1%±2.6, 18.3%±2.6, 18.7%±2.8, 20.7%±3.0, 22.0% ±3.3 and 24.6%±3.6, respectively. *O. ostertagi* isolates were phylogenetically close to *T. circumcincta, Tr. axei, C. oncophora, N. spathiger, M. digitatus* and *H. contortus* with the ratios 15.2%±2.3, 15.8%±2.4, 16.3%±2.6, 17.3%±2.6, 19.8%±3.0 and 20.7%±3.0, respectively. β tubulin isotipe-1 gene sequences of some isolates which were selected by means of sensitive and resistant allele frequencies were also determined and single nucleotide polymorphisms (SNPs) were investigated according to the benzimidasole resistance. No polymorphism was seen in all the isolates belong to sensitive allele whereas SNPs were detected in the codon 200 of the two isolates belong to resistant allele and transformation of phenylalanine (TTC) to tyrosine (TAC) at this codon was determined in both isolates.

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

Key words: Benzimidazole resistance, cattle, *Haemonchus contortus*, molecular characterization, *Ostertagia ostertagi*, real time PCR

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Trichostrongyloidae üst ailesinde mide-bağırsak sistemine yerleşen nematodlar sığırlarda oluşturdukları patojenite ve yüksek verim kayıplarıyla oldukça önem arz etmektedir. Bunlar arasında abomasuma yerleşen *Ostertagia ostertagi* ve *Haemonchus* türleri (*H. contortus* ve *H. placei*) en yaygın türlerin başında gelmekte olup verim kayıplarından primer sorumlu türler olarak nitelenmektedirler. Son yıllarda çeşitli konaklarda Trichostrongylid nemotod türlerinin spesifik teşhisi, epidemiyolojisi, kontrol programlarının şekillendirilmesi ve anthelmentik dirençliliğinin belirlenmesinde moleküler biyolojik teknikler sahip olduğu yüksek sensitivite ve spesifite ile kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle sekans ve filogenetik analizlerle bir çok tür için inter ve/veya intra spesifik varyasyonların varlığı ortaya çıkarılmış ve farklı coğrafyalardaki parazit nesilleri arasındaki filogenetik ilişkiler araştırılmaya başlanmıştır. Türkiye'de günümüze kadar sığırlarda trichostrongylid nematodlar ve benzimidazol dirençliliği üzerine moleküler bazlı herhangi bir çalışma yapılmamıştır (1).

Bu proje çalışmasında Kayseri, Yozgat, Nevşehir ve Kırşehir illerinden örneklenen farklı yaş, ırk ve cinsiyetteki sığırlar araştırma materyalini oluşturmuştur. Sığırlardan toplanan dışkı örnekleri trichostrongylid yumurtaları yönünden incelenmiş, pozitif belirlenen örnekler dışkı kültürüne alınarak L3 gelişimi sağlanmıştır. Moleküler analizler amacıyla genomik DNA ekstraksiyonu hem pozitif dışkılardan elde edilen yumurtalar hem de dışkı kültürü sonucu izole edilen L3 üzerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genomik DNA ekstrakları *O. ostertagi* ve *Haemonchus* türlerinin mithocondrial cytochrome c oxidase subunit1 (mt-COI) gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler sybergreen Real Time PCR'da analizlere tabi tutulmuştur. Belirlenen Ct (dR) değerlerine göre örneklerde pozitiflikler saptanmış ve uygun Ct (dR) konsantrasyondaki izolatların mitochondrial mt-COI gen bölgeleri parsiyel olarak genel primerlerle amplifiye edilmiştir. PCR ürünleri sonraki basamakta jel pürifiye edilerek uygun plazmid vektörlere klonlanmış, kolonilerde hedef türlere ait gen bölgelerinin konfirmasyonu geliştirilen sybergreen Real Time PCR ile sağlanmış ve hedef gen bölgelerini içeren kolonilerin transformasyonu takiben rekombinant plamid pürifikasyonu yapılmıştır. Rekombinant plazmidlerde hedef gen bölgelerinin sekans analizleriyle ilgili izolatların moleküler karakterleri ve nükleotid dizilimleri ortaya konmuş ve GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca moleküler karakterleri ortaya konan ilgili izolatların Dünyadaki GenBank'a kayıtlı mevcut homolog izolatlarla hizalama analizleri yapılarak filogenetik

yapılanmaları ortaya çıkarılmıştır. Çalışmada ayrıca Real Time PCR analizlerinde *Haemonchus* türleri yönünden pozitif belirlenen örneklere ait genomik DNA izolatlarında SYBR Green Real Time PCR tekniği ile benzimidazol dirençliliği araştırılmış, duyarlı ve dirençli allel sıklıkları belirlenerek, bazı izolatların sekans analizleri ile SNPs analizleri gerçekleştirilmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1 SIĞIRLARDA OSTERTAGİOSİS

Ostertagia türlerinin sebep olduğu bu hastalık, dünyanın soğuk veya ılıman bölgeleri başta olmak üzere birçok yerinde "brown- stomachworms" hastalığı olarak bildirilmektedir. Hastalık nedeni olan türler arasında *Ostertagia ostertagi* özellikle sığırların PGE (parazitik gastro enteritis) etkeni olarak dikkat çekmektedir. Meraya ilk defa çıkan buzağılar ve direnci yetersiz olan genç sığırların bu hastalığa oldukça duyarlı oldukları bilinmektedir. Ostertagiosis'de, diğer mide bağırsak nematodlarından farklı olarak, iki yaşından önce gerçek bir direnç oluşmaması, re-enfeksiyonların önemini arttırmaktadır. Ostertagiosis, insanlarda "Menetrier's Disease" olarak bilinen bir hastalık için model oluşturulması bakımından da önemli görülmektedir (2).

2.1.1 *Ostertagia ostertagi*'nin Sınıflandırmadaki Yeri

Ostertagia ostertagi'nin Systema Naturae 2000'e göre sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir (3).

Domain **Eukaryota** Chatton, 1925 - eukaryotes
"neokaryotes" - mitochondrial eukaryotes
"neozoa"
"scotokaryotes" Cavalier-Smith, 1999
"podiates" Cavalier-Smith, 2013
Amorphea Adl et al., 2012
Opisthokonta Cavalier-Smith, 1987
Holozoa
filozoa Shalchian-Tabrizi, Minge, Espelund, Orr, Ruden, Jakobsen & Cavalier-Smith, 2008
Kingdom **Animalia** Linnaeus, 1758 - animals
Epitheliozoa Ax, 1996
Eumetazoa Bütschli, 1910 - eumetazoans
Bilateria Hatschek, 1888 - bilaterians
Eubilateria Ax, 1987
Protostomia Grobben, 1908
Ecdysozoa A.M.A. Aguinaldo et al., 1997 - ecdysozoans

Introverta C. Nielsen, 1995

Nematoida A. Schmidt-Rhaesa, 1996

Phylum **Nematoda** (Rudolphi, 1808) Lankester, 1877 - round worms

Genus **Ostertagia** Ransom, 1907

Ostertagia ostertagi (Stiles, 1892)

2.1.2 *Ostertagia ostertagi*'nin Morfolojisi

Ostertagia ostertagi türüne evcil ve yabani geviş getiren hayvanların abomazumlarında, nadiren ince bağırsaklarında rastlanmaktadır. Yeni alınmış dışkı örneklerinde kahve renkli, ince yapılı olarak olarak görülen parazitlerin vücudunu saran kütikulası üzerinde enine çizgiler bulunmamakta, erkelerde bulunan spiküllerin kısa, benekli ve kahverenginde oldukları görülmektedir (4). *O. ostertagi* erkekleri 6,5-7,5 mm, dişileri 8,3-9,2 mm uzunluktadır. Spikülümleri 220-230 µm kadardır. Spikülümün her biri distal ucunda kitini membranla sarılı üç çatallı bir görünüş arz eder. Gubernaculum 40 µm uzun ve 14 µm genişliktedir. Dorsal kaburga tek çıkıp önce ikiye ayrılır, daha sonra her bir uç tekrar iki küçük dala ayrılarak sonlamr. Vulva arka uçtan 1,5 mm mesafede olup belirli bir kapak taşır. Anüs arka nihayetten 100-140 µm uzakta yer alır. Dişilerin distal ucu gittikçe incelerek yuvarlak bir uçla sonlanır. Yumurtaları 38-44 x 74-90 µm çapındadır. Ağız yolu ile alınan üçüncü dönem enfektif larvalar ortam şartlarının elverişsiz olduğu durumlarda dördüncü dönem larva halinde abomasumda nodüller içerisinde altı ay kadar gelişmelerini durdurarak hipobiosis halinde yaşayabilirler (1).

2.1.3 *Ostertagia ostertagi*'nin Yaşam Döngüsü

Parazitlerin yumurtaları içerisinde farklı sayıda blastomer bulunmakta, dış ortamda uygun şartlar bulunduğunda L1'ler kendi çabalarıyla aktif olarak yumurtalardan çıkmakta ve dış ortamda, mikroorganizmalarla beslenmekte ve gelişerek gömlek değiştirip L2 olmaktadırlar. Aynı şekilde L2'ler de dış ortamda beslenerek, gelişip, gömlek değiştirerek enfektif L3 halini almaktadırlar. L3'ler yağmur ve nem gibi etkenlere bağlı olarak meradaki ruminantların beslenirken alacakları otlara ulaşmaktadırlar. Özellikle ıslak otlar bu olayda önemli rol oynamaktadır. Otlarla birlikte peros alınan larvalarla gerçekleşen enfeksiyon, L3'lerin rumende L2 döneminden kalan eski kılıflarından kurtularak abomazumdaki gastrik bezlerde gömlek değiştirip,L4 halini almaları ile devam etmektedir. Enfeksiyonun on sekiz ile yirmi birinci günlerinde sekiz milimetreye ulaşan L4'ler gömlek değiştirerek gelişmekte, meydana

gelen L5'ler gastrik bezlerden çıkarak abomazum yüzeyine ulaşmaktadırlar. Bazen L4'ler hipobiyoza girmekte ve gelişim bir kaç ay uzayabilmektedir. Genellikle üç ile beşinci haftalarda erişkin hale gelen parazitler yumurtlamaya başlamakta ve dışkıda yumurta görülebilmektedir (1).

2.1.4 *Ostertagia ostertagi*'nin Epidemiyolojisi

2.1.4.1 *Ostertagia ostertagi*'nin Türkiye'deki Yayılışı

Türkiye'deki sığırlarda *O. ostertagi*'nin prevalansı; Ankara'da % 92,86 (5), Türkiye'nin değişik bölgelerinde %22 (6), Samsun yöresinde %65,5 (7), Marmara Bölgesi'nde %87,5 (8), İç Anadolu Bölgesi'nde %20,8 (9), Bursa'da %27,27 (10), Kars'ta %92 (11), Afyon'da %10,30 (12), Kayseri'de %35 (13), Konya'da %3 (14) ve Elazığ'da %63,26 (15) oranlarında rapor edilmiştir.

2.1.4.2 *Ostertagia ostertagi*'nin Dünyadaki Yayılışı

Sığırlarda *O. ostertagi* prevalansı, Suriye'de (16) %61,76, Japonya'da % 63,6 (17), İskoçya'da %83 (18), Çekoslovakya'da % 0,6 (19), Belçika'da %87 (20) ve %90 (21), Hollanda'da %97 (22), İspanya'da %60,4 (23), ABD'de %85 (24), %98,5 (25) ve %98 (26) ve Avusturya'da %81,4 (27) olarak rapor edilmiştir.

2.1.5 *Ostertagia ostertagi*'nin Patojenitesi

Parazitin sığırların abomazumundaki gastrik bezlerde bulunduğu süre içerisinde paryetal hücrelerin yapısını bozarak asidik salgı üretimine engel olmasına bağlı olarak klinik belirtiler oluşmaktadır. Örneğin pH6 ve üzerinde pepsinojen enzimi, pepsine dönüşememekte, emilerek kan dolaşımına karışmakta, protein sindirimi aksamaktadır. Kandaki pepsinojen seviyesindeki artışı albümin seviyesindeki düşüş izlemektedir. Abomazumdaki asidik ortamın kaybolmaya başlaması, bakteriyostatik dengeyi bozmakta ve normal flora bozulmaya başlamaktadır. Bu tablo akut ishal, kondisyon kaybı ve iştahsızlıkla devam etmektedir. *Ostertagia ostertagia*'da klinik tablonun oluşmasına yol açan patolojik tablo, birbiriyle ilişkili biyolojik olayların gerçekleşmesiyle oluşmaktadır (28). Sığırların abomazum nematodu olan *O. ostertagi* enfeksiyonlarında asit salgılayan paryetal hücreler azalmakta ve gastrik pH yükselmektedir. Deneysel enfeksiyonlara göre gastrine özgü mRNA ekspresyonu ile gastrinin kan ve dokulardaki farklı moleküler formlarının konsantrasyonları ölçülmüştür. Buna göre enfeksiyondan 28 gün sonra kan gastrin konsantrasyonu yükselmeye başlamıştır. Kan gastrin

düzeyi yani gastrin-34 (G-34) artarken kontrol gruplarında ise gastrin-17 (G-17) artmıştır. Gastrine özgü mRNA ekspresyonu, enfekte hayvanlarda on bir kat artarken, pilorik mukozal gastrin seviyesi %23,8 oranında azalmış kandaki gastrin ise artmıştır. Sonuç olarak hipergastrinemi görülen enfekte hayvanlarda gastrin sentezinin, paraziter patolojiye bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir.

Enfeksiyonun 18. günü dışkıda yumurta görülmeye başladığında, yumurta atılımı 23. güne kadar artarak devam etmektedir. Enfeksiyonun 28. günü yapılan nekropside tespit edilen parazitlerin ortalama %85'i abomazum lümeninde bulunmuştur. Enfekte hayvanlarda serum pepsinojen değeri 14. günden 28. güne kadar artarak yükselmiştir. Enfekte hayvanlarda serum gastrin değeri 21. günden 28. güne kadar artarak yükselmiştir. Fundus mukozasının ağırlığı kontrol grubundakilere göre %95,6 oranında artmıştır (abomazum hiperplazisi ve ödem). Amerika Birleşik Devletlerinde sığırlar üzerinde yapılan deneysel *O. ostertagia* enfeksiyonlarında, sığırların genotiplerine göre üç farklı tipte fenotipik yanıt verdikleri gözlenmiştir. Buna göre; Tip 1 sığırlar asla çok yüksek EPG değeri vermemiştir, Tip 2 sığırların EPG değerleri her zaman düşük kalmıştır, Tip 3 sığırlar sürekli yüksek EPG değerleri vermiştir. Bu durum sığırların mide barsak nematodlarına karşı genotipik özelliklerine bağlı olarak değişik derecelerde yanıtlar verebildikleri şeklinde yorumlanmaktadır (29).

Sığırların ırk ve bireysel genotipik özelliklerinin yanı sıra antihelmintik ilaç direnci veya baskısı, re-enfeksiyon sıklığı, beslenme, yaş, gebelik, doğum gibi stres faktörleri, hatalı sürü yönetimi teknikleri, enfestasyon oranı ve değişik ekocoğrafyalardaki aynı parazit türüne ait, alt tiplerin farklı virülansları, abomazal ve intestinal parazit yükleri gibi unsurların, konağın antiparaziter immün yanıtı üzerinde pozitif veya negatif etkilerinin olacağı şeklinde değerlendirilmektedir (30, 31).

Mukoza tabakası canlıların eksojen etkenlere karşı primer savunma hattını oluşturmaktadır. Abomazumda bulunan mukus tabakası da bu ödevi görmektedir. Müsinler veya mukus glikoproteinleri ise bu mukus bariyerinin en önemli bileşenleri olarak bilinmektedir. Sığırlarda dokuz adet membran bağımlı müsin ve salgılanan sekiz adet müsin bulunmuştur. Membran bağımlı müsinler genellikle epitel hücrelerin apikal membranlarında hücre sinyalizasyonunda görev almaktadırlar, jelatinöz ve viskoelastik yapılar da mukus oluşumunda yer almaktadırlar. Burada önem taşıyan müsinlerin, müsin glikolizasyonu sayesinde sindirim enzimlerinden ve düşük pH dan koruması yanında mukozal enfeksiyon ve

yangı durumlarında koruyucu etkinlik göstermesi olup, bu olayın devamlılığını doku spesifik bazı enzimlerin ekspresyonu sürdürmektedir. Mukus hücrelerinin hiperplazisi, yüzey epitelinin hasarı ve asit üreten paryetal hücrelerde meydana gelen kayıplar, glikogenlerin trankripsiyon seviyeleri ve müsin glikolizasyon düzeninin abomazumdaki parazit yüküne bağlı olarak değişmesiyle doğrudan alakalı bulunmaktadır (32).

Abomazum mukozasının plikalar içeren normal görünümünün, patojen "maroken" görünümü alması görülmektedir. Bu durumun gelişiminde abomazumdaki bakteri popülasyonunun artmasına neden olan pH yükselişi, protein denatürasyonunun engellenmesi, pepsin/pepsinojen dengesinin bozulması, abomazum mukozası geçirgenliğinin artması, kandaki plazma proteinlerinin abomazum lümenine, abomazumdaki pepsinojenin de kana geçmesi gibi etkenlerin rol oynadığı bildirilmektedir (33).

2.1.6 *Ostertagia ostertagi* Enfeksiyonlarında Klinik Belirtiler

Tip 1 Ostertagiosis: Oldukça kısa zaman içerisinde çok fazla miktarda enfektif larva alınması ile abomazumun fundus ve korpus kısımlarında gastrik bezler içerisinde gelişen larvalara bağlı olarak akut gastrik disfonksiyon oluşmaktadır. Salgı bezlerinde dilatasyon, fonksiyon kaybı, mukozal konjesyon, submukozal ödem gelişmektedir. Özellikle ilkbaharın erken geldiği senelerde mart ayı itibariyle meraya çıkmaya başlayan süt inekleri, buzağı ve danalar bir önceki yaz mevsiminden kalan enfektif larvaları almaktadırlar. Bu larvalar ile enfekte olan hayvanlarda L3'ler üç hafta içerisinde doğrudan gelişerek mayıs, haziran ve temmuz aylarında yumurta çıkarmaya başlamaktadır. Sezonun o yılki özelliklerine bağlı olarak mera ağustos ve eylül aylarında oldukça yüklü miktarda parazit ile kontamine olmakta, *O. ostertagia* ya bağlı PGE tablosu buzağı, dana veya direnci yeterli olmayan sığırlarda meydana gelmektedir. Sonbaharda doğan buzağıların yukarıda anlatıldığı şekilde mart, nisan aylarında ilk defa böyle kontamine meralarda otlatılması ile ağır enfeksiyonun oluşmaktadır. Bu hayvanlarda mukozada az sayıda inhibe larva ve abomazum lümeninde ise çok sayıda L5 bulunmaktadır (1y).

Tip 2 Ostertagiosis: Özellikle yaşlı hayvanlarda kış sonu veya ilkbahar mevsiminde ilk otlatma sezonunda inhibe haldeki L4'lerin eş zamanlı olarak gelişmelerine tekrar başlamaları ve L5'lerin dönem dönem abomazum mukozasına geri dönmeleri ile enfeksiyon oluşmaktadır. Larvaların inhibisyon halinden çıkışı tam manasıyla eş zamanlı olarak meydana gelmez ise klinik tablo net olarak gözlenememektedir. Bu tip ostertagiosis, ağır kayıplara ve ölüme neden olabilmektedir. Bu şekilde hastalanan hayvanların ahırlarda tutulması

önerilmektedir. Bu durumda mukozada çok sayıda gelişmekte olan larva bulunurken, abomazum lümeninde ise az sayıda L5 bulunmaktadır (1).

2.1.7 Ostertagiosis'in Tanısı

Hasta olan ve merada otlayan hayvanlarda çok sulu, yeşil renkli ishal dikkati çekmektedir. Hayvanlarda canlı ağırlık kaybı oluşmaktadır. Yetersiz beslenme ve yetersiz emilime bağlı protein kaybı nedeniyle, hafif hipoalbübinemi, kronik vakalarda ise çene altı ödemi gözlenmektedir. Bu hastalığa kuzey bölgelerde özellikle yaz sonu ve sonbahar aylarında rastlanması ön tanı hakkında fikir verebilmektedir. Sığırlarda parazitlenen nematodlardan *Nematodirus, Bunostomum, Strongyloides* ve *Trichuris* cinsleri enfeksiyonlarında dışkıda görülebilen yumurtaların tanısıyla bu parazitler birbirinden ayırt edilebilmektedir. Ancak diğer bazı cinslerin ayırıcı tanısı için mutlaka dışkı kültürü yapılarak L3'lerin elde edilerek incelenmesi önerilmektedir. Nekropsi, mide barsak nematodlarının tanısında altın standart metottur. *Haemonchus, Bunostomum, Oesophagostomum, Trichuris* ve *Chabertia* cinslerine ait ergin parazitler, çıplak gözle fark edilebilmekte, ancak *Ostertagia, Trichostrongylus, Cooperia* ve *Nematodirus* cinsleri metrelerce uzunluktaki bağırsaklara yayılmış olmaları sebebiyle kolay görülememektedirler. Bu küçük nematodlar mide barsak kanalının yıkanmasıyla, toplanan içeriğin uygun mesh aralığındaki eleklerden geçirildikten sonra birikintinin beş dakika süre ile güçlü bir iyot boyası ile boyanarak ardından dekolore (5% sodium thiosulphate - hypo) edilerek beyaz zemin üzerindeki petri kaplarında incelenmesi ile saptanabilmektedir. Buna benzer yöntemler, antihelmintik direnci gibi araştırmalarda da uygulanmaktadır (1).

2.1.8 Ostertagiosis'in Tedavisi

Erişkin ve inhibe larvalara karşı etkili olan albendazole, fenbendazole, oxfendazole, febantel, ivermectin, doramectin, eprinomectin ve moxidectin gibi ilaçlar kullanılabilir (1).

2.1.9 Ostertagiosis'te Korunma ve Kontrol

Meraların birer yıl dinlendirilerek kullanılmasının çok faydalı olabileceği, ilaç uygulanan hayvanların parazit ile kontamine meralardan uzak tutulması önerilmektedir. Çiftliklerden toplanarak soğutma tanklarında depolanan sütlerden yapılan örneklemeler, ParaCalc olarak geliştirilen bir dizi kar-zarar analizi sistemi, incelediği değişik parametrelerin yanında ELISA testleri ile sütte paraziter antijen veya antikorlar aranarak oransal kıyaslamalar ile verimlilik

hesaplamaları yapabilmektedir. Buna göre sığırlarda mevcut parazit tür ve yükünün, konağın farklı fizyolojik dönemlerinde yol açtığı ekonomik kaybı, süt üretimini baz alarak, tedavi giderleri ve arınma süreci ile birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (34).

2.2 SIĞIRLARDA HAEMONCHOSİS

Hastalık, Trichostrongylinae familya altı *Haemonchus* cinsinde bulunan türler tarafından oluşturulmakta olup tropik ve subtropik bölgelerde sığır, koyun, keçi, manda, zürafa, antilop ve yabani ruminantların abomazumlarına yerleşmektedir. Sığırlarda haemonchosis oluşturan üç tür (*H. placei, H. similis* ve *H. contortus*) bildirilmektedir. Erişkin parazitler abomazum mukozasına tutunur ve kan ile beslenerek anemiye, şiddetli enfeksiyonlarda ise ölüme yol açarak ruminatların en patojen nematodlarından biri olmaktadır. Parazit aynı zamanda ruminantlarda, büyüme geriliği, verim düşüklüğü, hematolojik ve biyokimyasal değişiklikler, iştahsızlık, kilo kaybı, protein miktarında azalma, sindirim sistemi bozuklukları, üreme performansının düşmesi, et ve yün kaybına neden olmaktadır (35, 36). *Haemonchus* türleri arasında *H. contortus*'u diğer türlere göre daha tehlikeli yapan faktör antihelmintiklere karşı hızla direnç göstermesidir. Genel olarak *H. contortus*'un sığır, koyun ve keçilerde; *H. placei* ve *H. similis*'in ise sadece sığırlarda hastalık oluşturdukları bildirilmektedir (37-40)

2.2.1 *Haemonchus* Türlerinin Sınıflandırmadaki Yeri

Haemonchus türlerinin Systema Naturae 2000'e göre sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir (3).

Domain **Eukaryota** Chatton, 1925 - eukaryotes
"neokaryotes" - mitochondrial eukaryotes
"neozoa"
"scotokaryotes" Cavalier-Smith, 1999
"podiates" Cavalier-Smith, 2013
Amorphea Adl et al., 2012
Opisthokonta Cavalier-Smith, 1987
Holozoa
filozoa Shalchian-Tabrizi, Minge, Espelund, Orr, Ruden, Jakobsen & Cavalier-Smith, 2008
Kingdom **Animalia** Linnaeus, 1758 - animals
Epitheliozoa Ax, 1996

Eumetazoa Bütschli, 1910 - eumetazoans

Bilateria Hatschek, 1888 - bilaterians

Eubilateria Ax, 1987

Protostomia Grobben, 1908

Ecdysozoa A.M.A. Aguinaldo et al., 1997 - ecdysozoans

Introverta C. Nielsen, 1995

Nematoida A. Schmidt-Rhaesa, 1996

Phylum **Nematoda** (Rudolphi, 1808) Lankester, 1877 - round worms

Class **Secernentea** Von Linstow, 1905

Subclass **Rhabditia**

Genus **Haemonchus** Cobb, 1898

2.2.2 *Haemonchus* Türlerinin Morfolojisi

Haemonchus türleri arasında morfolojik farklılıklar görülebilmektedir. Ergin dişi parazitler genel olarak 18-30 mm uzunluğunda, yaklaşık 500 µm genişliğindedir. Ergin bir dişi parazit günde 10.000'den fazla yumurta yumurtlamaktadır. Kuyruk 400-630 µm uzunlukta olup, hızla incelir ve sivri olarak sonlanır. Vulva vücudun arka yarısında yer alır ve dil şeklinde bir kapağa sahiptir. Yumurtaları, 70-85 X 41-48 µm çapında strongil tip yumurtadır ve yumurta konağın dışkısına geçtiğinde embriyo 16-32 hücreye bölünür. Erkekleri hafif pembe renkli iken, dişilerin beyaz renkli ovaryumları kırmızı renkli bağırsakların etrafına dolanmış durumda olduğundan dalgalı beyaz, kırmızı-kahve renkli görünürler. Ergin erkekler ise genel olarak 12-20 mm uzunluğunda, 400 µm genişliğinde ve dişilerden daha zayıftırlar. Spikülümler ortalama 0.46-0.506 mm uzunluğundadır ve her biri küçük birer çıkıntı taşır (1, 41)

2.2.3 *Haemonchus* Türlerinin Biyolojisi

Haemonchus türlerinin preparazitik gelişimi diğer mide-bağırsak kıl kurtlarına benzemektedir. Parazit direkt yaşam siklusuna sahiptir. Dişilerin yumurtlama kapasitesi çok yüksektir. Ergin bir dişi parazit, günde 7000-10.000 yumurta yumurtlamaktadır. Hayvanların dışkısı ile dışarı atılan yumurtalar içerisinde L1'ler gelişir ve yumurtayı terk ederler. Uygun nem ve ısı durumlarında L1'den L3'lerin gelişmesi için gerekli süre optimum koşullarda 5 gün olmasına rağmen, bu süre havaların serin olduğu durumlarda haftalar veya ayları

bulmaktadır. Sığırlar otlarla birlikte L3'leri alarak enfekte olmaktadır. Rumende 3. dönem larvalarda L2'den kalma kılıf atılır ve larvalar abomazuma göç ederek mide mukozasına penetre olurlar ve gömlek değiştirerek 4. dönem (L4) larva haline gelirler. 4. dönem larvalar ağız kapsüllerinde gelişen delici lanset yardımıyla kan damarlarından kan emerler. Kan emdikleri yerlerde kanamalara neden olduklarından hayvanda anemi şekillenir (1, 41). İç ve dış çevre şartları (makro ve mikro çevresel durumlar, konağın immün yanıtı ve genetik yapısı) uygun olduğunda pre-patent süre koyunlarda yaklaşık 3, sığırlarda 4 haftadır. L4'ler soğuk, kuraklık ve aşırı sıcak gibi uygun olmayan koşullarda konakta hipobiyoza girererek metabolizma ve gelişimlerini yavaşlatırlar. Hipobiyoz kuraklık ve sıcaklığın arttığı yaz ortalarında başlar ve gittikçe artarak sonbaharda %70-80'lere, kışın ise %100'e ulaşır. Larvaların hipobiyozdan çıkması çevre koşullarının uygun hale gelmesi ile olur. Çevre koşullarının uygun hale gelmesi ile birlikte dördüncü dönem larvalar mide mukozasından ayrılarak mide lümenine gelir ve burada tekrar gömlek değiştirerek 5. dönem larva veya genç olgun haline gelirler. Seksüel olgunluğa erişen larvalar daha sonra çiftleşirler (42, 43). *H. contortus*'un biyolojisi *H. placei*'den daha hızlı gelişebilmektedir. Danalarda *H. contortus*'un pre-patent süresinin 18-21 gün, *H. placei*'nin ise 24-28 gün olduğu bildirilmektedir (1).

2.2.4 *Haemonchus* Türlerinin Epidemiyolojisi

2.2.4.1 Haemonchosis'in Türkiye'deki Yayılışı

Türkiye'de sığır ve mandalarda sadece *H. contortus* türünün varlığı bildirilmekte olup (44) bu parazitin prevalansı; Türkiye'nin değişik bölgelerinde %10,99-22 (6), Marmara Bölgesi'nde %47,9 (8), İç Anadolu Bölgesi'nde %8,3 (9), Kayseri yöresi sığırlarında %4 (13), Afyon yöresinde %20,83 (12), Elazığ yöresinde %5 (15), Kars ve Konya yöresinde %8 (11, 14), Samsun yöresinde %23,9 (7) ve Bursa yöresinde %12,72 (10) oranlarında rapor edilmektedir.

2.2.4.2 Haemonchosis'in Dünya'daki Yayılışı

Sığırlarda *H.contortus* prevalansı, Suriye'de (16) %17,64, Japonya'da % 0,03 (17), Belçika'da %11,5 (21), ABD'de %54,4 (25), Brezilya'da %19,2 (45), Avusturya'da %6,7 (27), Gambiya'da %67 (46), Afrika Côte-d'Ivoire' da %95 (47), Pakistan'da %31,85 (48) ve Hollanda'da %2 (22) olarak rapor edilmiştir. Brezilya'da sığırlarda *H. placei*'ye %100, *H. similis*'e %29 (49), Kenya' da sığırlarda *H. placei*'ye %67 (50) oranında rastlanıldığı bildirilmektedir.

2.2.5 Haemonchosis'in Patogenezi

Hastalık özellikle buzağı ve danalar için çok önemli olup, abomazum mukozasına gelen genç larvalar üçüncü gelişme döneminden sonra L4 olmaktadırlar. Bu evre kan emerek beslenme evresidir. Bu evrede larvaların ağız yapısı, abomazum mukozasından kan emebilecek duruma gelmektedir. Larvanın kan emerken yara odağına antikoagülan bir madde (kontortin) salgıladığı kabul edilmektedir (51). Larvaların sayısına bağlı olarak abomazum mukazasında, çok şiddetli doku irritasyonları ve reaksiyonlar meydana gelebilmektedir. Bu dönemde protein, fosfor ve kalsiyumun sindirim ve emiliminde ciddi yetersizlikler oluşabilmektedir. Hayvanlarda zamanla güç kaybı, sallanarak yürüme gibi semptomlar görülebilmektedir.

Haemonchosis'in patogenezinde çeşitli faktörler rol oynamaktadır. Hastalığın gelişimi açısından, parazitin virulansı, konağın genetik yapısı, yaşı, ırkı, konağın immun yanıtı ve stres önemli faktörler arasında bulunmaktadır. *H. contortus*'un ana patojenik mekanizması mide mukozası üzerindeki direkt lezyonların görülmesi ile olmaktadır. Enfekte ruminantlarda konak-parazit gelişimi boyunca immun sistem yanıtları, özellikle abomazumda morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere neden olmaktadır. Aynı zamanda bazı kan parametrelerinde değişiklikler gözlenmekte ve bu durum hem anemik duruma hem de sindirim-emilim sendromlarının bozulmasına neden olmaktadır (43) .

Saha ve deneysel çalışmalar ile abomazum nematodlarının konak üzerindeki morfolojik ve fiziksel etkileri incelenmiştir. Konak üzerindeki etkileri, nodul oluşumu, mukoz hücre hiperplazı, süperfisyal epitel zararları, asit salınımını azaltan, serum gastrin ve pepsinojen konsantrasyonunu artıran doku tamiridir (52). Parazitli abomazumlarda, mide bezlerindeki larvalardan dolayı mide disfonksiyonu ve süperfisyal epiteller zarar görmektedir. Mukoza üzerinde bulunan ergin parazitlerin hareketleri, parazit ve kimyasalların geçişine izin verirken difüzyonu engellemektedir. Abomazum hipoasiditesi, pepsinojen aktivasyonunu azaltmakta ve aynı zamanda enfeksiyonun başlangıç safhalarında gastrin salgılanması için gerekli olmaktadır. Artan serum pepsinojen konsantrasyonu mukoza boyunca pepsinojenin geri difizyonundaki artışa bağlanmaktadır (53).

H. contortus'un erginleri günde 0,05 ml kan emmektedir (54). Toplam hücre hacmindeki (PCV) azalma ile birlikte belirgin bir şekilde kan kaybı görülmektedir. Bu parametreler, parazitin virulansında marker olarak (55, 56) ve haemonchosis'de parazit yükünün dolaylı olarak belirlenmesinde kullanılmaktadır (57, 58). PCV'deki azalma, mukozadan L4'lerin

çıkışına rastlayan enfeksiyondan sonraki 4 gün içinde görünür hale gelmektedir. Genç ve ergin parazitlerin kan emme isteğindeki kombine etki, parazitlerin ağız boşluğunda iyi gelişmiş lansetlerin bulunması ve enfeksiyon bağımlı hemorojik gastritisin neden olduğu mide-bağırsaktaki kan kaybından dolayı PCV'deki azalma patent periyodun (enfeksiyondan sonraki 3. hafta) başlaması ile hızlanmaktadır (59, 60). Minumum değerlere ise enfeksiyonun 7. haftasında ulaşılmaktadır (61). PCV değerindeki azalma, hemoglobin konsatrasyonundaki (5,3-7,7 mg/dL) azalma ile aynı zamana denk gelmektedir. Bu durum parazitlerin salgıladığı hemolitik faktörlerin neden olduğu eritrositlerin lizis olması ve parazitin kan emme isteğinin artmasına bağlı olarak bağırsaklarda kan kaybı artışına neden olmaktadır (62,63).

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

Birinci evre: Enfeksiyondan sonraki 7-25. günler arasında olmaktadır. Bu dönemde serum demir düzeyi aynı kalırken toplam hücre hacmi hızla %33'den %22'ye düşmektedir. Toplam hücre hacmindeki hızlı düşüş, kanama ile oluşan kan kaybını telafi etmek için konağın eritropoiteik sisteminin aktive olması ve kan kaybı arasındaki zamanın uyumsuzluğundan kaynaklanmaktadır (1).

İkinci evre: Enfeksiyondan sonraki 6-14. haftalar arasında olmaktadır. Toplam hücre hacmi normal seviyeden düşük ancak sabittir. Bunun nedeni oluşan kan kaybına rağmen eritropoiteik sistem tarafından üretilen eritrositler ile kan kaybının karşılanmasıdır. Bu dönemde plazma demir düzeyinde ve dışkıda demir kaybında artışlar gözlenmektedir. Şiddetli kanamalarda demir emilimi en yüksek seviyede olmasına rağmen, sığırlarda bağırsaklardan demir emilimi sınırlı kapasiteye (bağırsaklardaki demirin yalnızca %11'i emilmektedir) sahiptir. Demir rezervlerinde ciddi azalmalar olmakta birlikte, kemik iliği ve serumdaki demir azalmaları ise aneminin 3. evresini göstermektedir (1).

Üçüncü evre: Bu evre demir eksikliği nedeni ile hemopoiteik sistemin displazi olmasından kaynaklanan toplam hücre hacmindeki hızlı düşüş ile karakterizedir (1).

Enfekte hayvanlarda mide kanaması, kan kaybı, mukoza geçirgenliğinin artışı ve hücre içi yapının bozulmasının bir sonucu olarak mide lümenine proteinlerin geçmesi, epitel hücre kayıpları, doku tamiri, mukus üretiminde artma ve immun sistemin protein sentez isteğinin artmasından dolayı plazma protein konsatrasyonunda önemli azalmalar olmaktadır (64, 65). *H. contortus* ile enfekte hayvanlarda serum proteinlerinin büyük bir kısmı dışkı ile dışarı atılmakta ve böylece günlük 210-340 ml plazma kaybı olmaktadır. Enfekte hayvanlarda

anemi, mideye besin geçişinin azalması, sindirim sisteminin bozulması, pepsin sentezini önleyen abomazum PH'sının artması, amino asit ve küçük peptitlerin absorbsiyonundaki azalma nedeni ile beslenme miktarlarında önemli azalmalar olmaktadır (66, 67).

Abomazumdaki PH artışı, mide mukozasının parietal hücrelerinin sentezlediği hidroklorik asit üretimi ve salgılanmasındaki azalmadan kaynaklanmaktadır. Abomazumda bulunan parazitler ortama amonyum gibi bazı maddeler salmaktadır. Amonyum, pepsin veya mide bezlerinin hareketini önleyerek parazitin etrafındaki PH değerini artırmakta ve böylece mide bezlerinin ana hücrelerinin ürettiği pepsinojenin pepsine dönüşümünü engellemektedir. Pepsinojen bu bezlerde birikmekte, daha sonra salınmakta ve kana geçmektedir (53, 56). Parazitlerin salgı-boşaltım ürünleri, asetil kolin, histamin, epitel büyüme faktörü ve gastrin gibi bazı maddelerin serbest kalmasını uyarmaktadır. *H. contortus* ile enfekte koyun ve keçilerde deneysel çalışmalarda serum pepsinojen değerinin enfeksiyonun 4-14. günlerinde artış gösterdiği belirlenmiştir (68, 69).

2.2.6 Haemonchosis'te Tanı

Genel olarak tüm hastalıklarda olduğu gibi haemonchosisde de hastalığı tedavi edebilmek ve bu hastalıktan korunma yöntemlerini geliştirebilmek için öncelikle bu hastalığın tanısının yapılması gerekmektedir. Bu amaçla tanı; klinik ve nekropsi bulguları, dışkı muayene yöntemleri, serolojik ve moleküler yöntemlerle yapılmaktadır (70, 71l).

2.2.6.1 Klinik ve Nekropsi Bulguları

Hastalık, genellikle duyarlı ve genç hayvanların yoğun olarak bulunduğu meralarda ortaya çıkmaktadır. Haemonchosis'de klinik belirtiler hiperakut, akut ve kronik olmak üzere 3 formda görülmektedir (1).

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

Akut Haemonchosis: Akut haemonchosis, genç ve duyarlı hayvanların ağır enfeksiyonlara yakalanmasıyla ortaya çıkmaktadır. Akut haemonchosis'in klinik belirtileri anemi, değişik derecelerde ödem, uyuşukluk, koyu renkli dışkı ve yapağı kırıklığıdır. Anemi, hipoproteinemi ve ödem (çene şişliği) ile birlikte olmakta ve enfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde anemiye bağlı olarak ölümler görülmektedir. Gram dışkıdaki yumurta sayısı 100.000'den fazladır. Abomazumda 1000-10.000 erişkin parazit bulunmakta, kaslarda ödem ve anemi şekillenmektedir. Anemi hızla gelişmekte ve buna bağlı olarak kemik iliğinde eritropoetik yanıt şekillenmektedir (1).

Kronik Haemonchosis: Kronik haemonchosis, son derece yaygın ve ekonomik önemi fazla olan bir enfeksiyondur. Bu enfeksiyon parazit sayısının düşük (100-1000) olduğu durumlarda ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyona bağlı olarak hayvanlarda kilo kaybı ve halsizlik görülmektedir. Morbidite %100, mortalite ise çok düşüktür. Anemi ve hipoproteinemi, hayvanların beslenme, eritropoietik sistemin durumu ve demir rezervlerine bağlı olarak hafif veya şiddetli olmaktadır. Ergin parazitler, kalsiyum ve calretikulin olarak bilinen pıhtılaşmayı önleyici bir protein (kontortin) üreterek konak üzerinde kolaylıkla beslenmekte ve bulunduğu yerde kanamalı lezyonlara sebep olmaktadır. Gram dışkıdaki yumurta sayısı 2000'den azdır. Post mortem incelemede, kemik iliğinde kronik genişleme ve hiperplazik gastritis görülmektedir (1).

2.2.6.2 Dışkı Bakısı Yöntemleri

Strongil nematod enfeksiyonlarının antemortem olarak tanısı, flotasyon (Mc Master sayımı), Baerrman tekniği veya larva kültürü metodları kullanılarak dışkıda nematod larvalarının belirlenmesi ve yumurta sayımı esasına dayanmaktadır. Ergin dişiler farklı üreme şekillerine sahip olduklarından gram dışkıdaki yumurta sayısı mide barsaktaki ergin nematod sayısı hakkında bize net bir bilgi vermemektedir. Bu durum özellikle *Trichostrongylus* gibi düşük üreme potansiyeline sahip nematodlarda görülmektedir. Ancak oldukça üretken olan bazı türlerde (*H. contortus, Oesophagostomum venulosum* ve *Chabertia ovina*) gram dışkıdaki yumurta sayısı (EPG değeri) ve bağırsaktaki ergin nematod sayısı arasında bir ilişki bulunmaktadır. *H. contortus, Trichostrongylus axei, Teladorsagia/Ostertagia spp*. ve *Nematodirus* spp. gibi ruminantların bazı strongylidlerinde çevre şartları uygun olmadığı zamanlarda larvalar hipobiyoza girerler ve böylece ergin dişiler tarafından yumurta üretilmez. Çevre şartları uygun hale geldikten sonra yumurtalar dışkı ile atılırlar (72, 73).

Strongil nematodların identifikasyonları, morfolojik karakterizasyonlarına, konak türlerine, konak ve çevredeki patolojik etkilerine göre yapılmaktadır. Ancak spesifik tür teşhisi bu kriterlere göre yapılamamaktadır. Birçok strongil nematod yumurtasının şekli, büyüklüğü ve yapısı birbirine benzemektedir. Özellikle çeşitli cins ve türlerin yumurtalarının sayısal olarak ölçümlerinde benzer yakınlıklar bulunmaktadır. Cins düzeyinde ayrım yapabilmek için, larva kültürü yöntemi kullanılarak dışkıda yumurtalardan 3. dönem larvaların gelişmesi sağlanmaktadır. Bu yöntem, zaman alıcı olması (ortam koşullarına bağlı olarak L3'lerin gelişmesi için 1-2 haftayı bulmaktadır) ve L3'leri identifiye etmek için deneyimli bir elemanın bulunması nedeniyle sınırlı kullanım alanına sahiptir (74-78).

2.2.6.3 Serolojik Yöntemler ile Teşhis

H. contortus'un neden olduğu enfeksiyonların spesifik teşhisinde çeşitli serolojik ve immünolojik (kopro antijen belirleme) yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler içerisinde enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dot-ELISA, hemagglutination (HA) ve complement fixation (CF) testleri bulunmaktadır. ELISA testi, parazitlere karşı serum antikorlarının ve çok sayıda örneğin aynı zamanda belirlenmesini sağlayan hızlı ve basit bir testtir. Test aynı zamanda geniş hayvan gruplarında seroepidemiyolojik çalışmalarda güvenilir bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tür testler dışkı inceleme yöntemlerine göre daha az zaman almaktadır. *H. contortus*'un tanısında parazitin E/S (excretory/secretory) antijenleri kullanılarak ELISA testi yapılmıştır (149). Dot-ELISA testinde, saf veya saflaştırılmış ES antijenleri kullanılmaktadır. ES antijenleri, koruma ve teşhis için güçlü antijen olduklarından prepatent periyot boyunca haemonchosis'in erken tanısında, fazla zaman almayan, kolay uygulanan ve basit bir test olan dot-ELISA testinde kullanılmaktadır (79-81).

2.2.6.4 Moleküler Yöntemler ile Teşhis

Hastalık etkenlerinin teşhisinde gerek mikroskobik gerekse serolojik yöntemlerde karşılaşılan olumsuzluklar nedeniyle son zamanlarda parazitin DNA veya RNA'sının varlığını ortaya koymaya yarayan PCR (Polymerase Chain Reaction), Multiplex PCR, Nested PCR, Reverse Transcriptase PCR, Real-Time PCR, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) PCR gibi moleküler tabanlı teknikler kullanılmaya başlanmıştır (82).

Enfeksiyonun spesifik teşhisi veya parazitlerin identifikasyonu için kullanılan PCR tabanlı testlerde bir veya daha fazla hedef DNA bölgesi belirlenebilmektedir. Bu yöntem, hedef organizmanın genomundaki, özgül bir DNA dizilimini, tekrarlayan şekillerde, binlerce kez çoğaltarak, kolaylıkla tespit edilebilir hale getirmektedir. Spesifik identifikasyon için hedef

DNA bölgesi popülasyon içindeki küçük bir farklılığı bile ortaya koyabilmelidir. Bu amaçla parazitlerin tür veya suş ayrımını yapacak çeşitli ribozomal (internal transcribed spacers (ITS-1 ve ITS-2),18S, 5.8S, 28S rRNA) ve mitokondriyal gen bölgeleri (NAD4, COI) üzerinde çalışılmıştır (82).

Moleküler tabanlı yöntemlerden olan real-time PCR'ın, 1990'ların başında gelişmesiyle birlikte PCR amplifikasyonu görünür hale gelmiştir. Real time PCR sistemi, floresan işaretli boya ve problar kullanılarak PCR çoğaltımını görünür hale getirmekte ve monitorize edebilmekte ve aynı zamanda birden fazla paraziti kantitatif olarak eş zamanlı tespit etmesiyle oldukça spesifik bilgiler sağlamaktadır. Yöntemin biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmakla birlikte tek nokta mutasyonlarını belirleme, hastalık etkeni patojenleri ve DNA hasarını belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi (single nucleotid polymorphism), kromozom bozukluklarının tespiti gibi birçok çalışmalarda da kullanım alanları bulunmaktadır (83-85).

Real time PCR tekniği ruminantlarda Trichostrongil nematod enfeksiyonlarının teşhisinde mikroskobik ve serolojik yöntemlerdeki sınırlamaların hızla önüne geçerek hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle son yıllarda öne çıkan tekniklerin başında gelmektedir. Ayrıca söz konusu teknik ile mutasyon analizleri ve gen ekspresyonları da hassas bir şekilde belirlenebilmektedir (86).

2.2.7 Haemonchosis'te Tedavi

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

Yılda bir kez küçük dozlarda (0,5-2 gram) verilen bakır oksitin kuzularda toksik etki yapmaksızın *H. contortus* enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olabileceği bildirilmiştir (87-91).

1940 yılında bakır sülfat yerine fenotiyazin kullanılmaya başlanmıştır. İlaç, hastalığın kontrolü ve elimine edilmesinde oldukça güçlü bir etkiye sahiptir. Fenotiyazin 1:10 oranında tuz konsantrasyonu ile kullanılmıştır. Bu dozun yan etkisinin oldukça az olduğu bildirilmiştir. 1960'larda *H. contortus* fenotiyazine direnç göstermeye başlayınca tedavide yeni antihelmintiklerin kullanılması gerektiği düşünülmüştür. Bu nedenle 1961'de Tiyabendazol ismi verilen benzimidazoller geliştirilmiştir. Bu ilaç hem ergin hem de larvalara karşı oldukça etkili olmasına karşın birkaç yıl sonra *H. contortus* bu ilaca da direnç göstermeye başlamıştır. Daha sonraki yıllarda ise tedavide benzimidazoller yanında imidazothiazoles (levamisole) ve macrocyclic lactones (ivermectin) geliştirilmiştir (87-91)

Tedavide kullanılan başlıca antihelmintikler şunlardır:

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

Antihelmintiklerin hedef alanları olarak iyon kanalları, enzimler, yapısal proteinler ve taşıyıcı molekülleri içeren proteinler olduğu kaydedilmiştir. Antihelmintikler oral veya enjekte şeklinde uygulanmaktadır. Antihelmintiklerin dönüşümlü olarak kullanılması ise onların parazitlere karşı etkinliğini artırmaktadır (92).

2.2.7.1 Benzimidazoller

1961 yılında Tiyabendazolün kullanılması ve etkili sonuç alınmasıyla birlikte etki gücü daha yüksek yeni antihelmintikler keşfedilmiştir. Tiyabendazol helmintlerin birçoğunda etkili bir

şekilde kullanılmış ve memeliler için toksisitesi düşük olarak üretilecek yeni ilaçlara zemin hazırlamıştır. Helmintlerde bu bileşiklerin etkisi üzerine yapılan çalışmalarda, bu bileşiklerin nematodların bağırsak hücrelerini ve cestodların tegümental hücrelerinin yapısını bozduğu tespit edilmiştir. Bu değişiklikler sırasında stoplazmik mikrotubullerin ortadan kalktığı ve benzimidazollerin salgı veziküllerinin mikrotubul bağlı taşınımı inhibe ettiği gözlenmiştir. *H. contortus* enfeksiyonlarında fenbendazolün öldürücü etkisi, bağırsak stoplazmasında salgı veziküllerinin dağılması sonucu salgı veziküllerinin taşınımının inhibe olması ile bağlantılı olduğu gözlenmiştir. Benzimidazoller biyokimyasal olarak proteinlerin alt birimi mikrotubullere (tubulin) geri dönüşümsüz ve çok yüksek afinite ile bağlanmakta ve böylece mikrotubullerin yapı ve fonksiyonunu bozmaktadır. Klasik antimitotik ajan kolşisin ile yapılan çalışmalarda bu bileşiğin polimerizasyon öncesinde ilk olarak tubuline bağlandığı tespit edilmiştir (93-105). Gelişen mikrotubullere kolşisin taşıyan tubullerin eklenmesi ve başka mikrotubul gelişmesi için diğer tubulin moleküllerinin katılması ile mikrotubuller yeteneğini kaybetmekte ve sonuçta inhibe olmaktadırlar. Spektroskopik analizler ile tubulin polimerizasyonu, β-tubulin monomeri içerisindeki küçük bir bölgenin ilaç bağımlı lokal yayılmasından kaynaklandığını göstermektedir. Böylece benzimidazollerin β- tubulin monomerleri üzerinde bulunduğu ve tubulin polimerizasyonunu inhibe ettiği kaydedilmiştir. Mikrotubuller ökaryotlarda mitoz bölünme, hareketlilik ve taşınım gibi çeşitli canlı fonksiyonlarına yardımcı oldukça dinamik, sık bulunan hücresel organellerdir. Bu yapıların birçoğu ayrı veya birleşik olarak sürekli dinamik bir şekilde bulunmaktadır. Bazı sistemlerde, ilaç-tubulin etkileşimi sonucunda serbest tubulinlerin toplanması ve mikrotubullerin kaybı ile bu dinamik yapı bozulmaktadır. Mikrotubuller birçok hücresel süreçte rol oynamakta ve eksikliğinde taşınım, hücre bölünmesi, sinir iletimi ve hücre farklılaşması gibi birçok hücre fonksiyonu bozulmakta ve sonuçta parazitin ölümüne neden olmaktadır (93-105).

2.2.7.2 Imidazothiazolller

Imidazothiazol, Levamisol, Tetrahydropyrimidines (pyrantel ve morantael) ve diğer yapısal ilişkili bileşikler nikotinik ilaçlardır. Bu grup ilaçlar kaslar üzerinde bulunan nicotinic acetylcholine (nACh) reseptörlerinin aktivasyonunu engelleyerek sürekli kas kasılması sonucu nematodlarda ve diğer parazitlerde spastik kas paralizine neden olmaktadırlar (92,106).

2.2.7.3 Macrocyclic laktonlar (Ivermectin)

İvermektin, avermektin'in yarı sentetik bir türevidir. *Streptomyces avermitilis* mikroorganizmasının fermente ürünü olan büyük makrosiklik lakton içermesi nedeniyle Merk tarafından 1980'de antihelmintik olarak kabul edilmiştir. Daha sonraki yıllarda ivermektin'in analogları moxidectin, milbemycin oxime, doramectin, selamectin, abamectin ve eprinomectin üretilmiştir. İvermektin, parazitlerin vücut duvarı kaslarının ve farinksin paralizisine sebep olmaktadır. *H. contortus'*da faringeal yutkunma üzerine ivermektin ve moxidectin'in etkisi üzerine yapılan çalışmalarda her iki ilacın hareket mekanizmasının aynı olduğu ancak bu bileşiklerin hedef bölgelere yanıtlarının farklı olduğu görülmüştür. Makrosiklik lakton antiparazitikleri, bloke olan faringeal yutkunma ile parazitlerin beslenmesini inhibe etmekte ve somatik kasların paralizini yapmaktadır. Bu makrosiklik laktonlar glutamate ve gamma-amino butyric aciti (GABA) bağlayarak sinir ve kas hücrelerinin hiperpolarizasyonuna ve böylece parazitin paralize olarak ölümüne sebep olmaktadırlar (107-109).

2.2.7.4 Praziquantel

Prazinoizokinolin türevi olan praziquantel, stoplazmik membranda kalsiyum permeabilitesini değiştirmekte ve sarkoplazmik retikulum içinde kalsiyum miktarının artmasına ve sonuçta parazitte kas kasılmasına neden olmaktadır (109).

2.2.7.5 Closantel

Closantel parazitin mitokondrisinde plazma proteinlerine bağlanarak ATP üretimini inhibe etmektedir. Intrategümental PH üzerine Closantel'in etkisini belirlemek için yapılan çalışmalarda Closantel'in birçok helmintin biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerini etkileyen membran aktif bir molekül olduğu tespit edilmiştir (110).

Benzimidazoller ve macrocyclic laktonlar, larva ve erginlere karşı etkili iken imidazothiazoller ergin ve son dönem larvalara etkilidir. 3 grup antihelmintik (Benzimidazoller, Makrosiklik laktonlar ve imidazothiazoller) sığırlarda *H. contortus* enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (111).

2.2.8 Antihelmintik Dirençliliği

Paraziter enfeksiyonlara karşı korunmada en etkili yöntemlerden biri antihelmintik ilaç kullanımıdır. Parazitin konakta çoğalmasını önlemek için, verilen ilacın konaktaki parazite ve bu parazitteki hedefine ulaşması gerekmektedir. Antihelmintik direçliliği, parazite karşı

kullanılan ilacın önerilen dozda ya da daha yüksek dozda verildiği halde paraziti etkilememesi veya etkinliğinin zayıflaması olarak tanımlanmaktadır. Parazitlerin antihelmintlere karşı dirençliliği ilk olarak 1957 yılında *H. contortus* enfeksiyonunda fenothiazine karşı saptanmıştır. Daha sonra yapılan saha ve moleküler tabanlı çalışmalar ile birçok nematod da bazı ilaçlara karşı direnç geliştiği görülmüştür (111).

Direnç oluşumunda önemli faktörlerden biri, konaklara sık aralıklarla aynı grup ilacın verilmesidir. Diğer bir faktör ise antihelmintiklerin önerilen dozdan daha düşük dozda kullanımıdır. Konak hayvana göre ilaç dozunun ayarlanması önemlidir. Gastrointestinal nematodlara karşı antihelmintik dirençliliğini etkileyen diğer önemli bir faktör ise konağın beslenme durumudur. Yapılan çok sayıdaki çalışmalar antihelmintiklere karşı direncin, konağın beslenme durumuna ve parazit enfeksiyonlarını düzenleme yeteneğine bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca konağın yaşı, cinsiyeti ve üreme durumuda direnç gelişimini etkileyen ikincil faktörlerdendir. Genel olarak populasyondaki genetik polimorfizm, direnç bağımlı allelelerin sıklığı, katılan genlerin sayısı, direnç mekanizmalarının karmaşıklığı, nematodun biyolojisi, direnç fenotipinde dirençli genlerin dominant veya resesif olup olmadığı, tedavi kapsamı, antihelmintiklerin varlığında veya yokluğunda duyarlı ve dirençli genotiplerin üreme formu, tedavi sıklığı, parazit taşınımı ve ilaç dozunu etkileyebilecek diğer uygulamalar ile antihelmintik dirençliliği gelişmektedir (112, 113).

H. contortus'ta antihelmintik dirençliliği her sınıf antihelmintiğin hedef alanlarına göre farklı şekillerde olmaktadır. Burada 3 ana mekanizma bulunmaktadır. Bunlar: ilaçların bağlanma yerlerinin değişimi, detoks olanlar ve membran taşıyıcılar ile ilaçların akışını sağlamaktır (112, 113).

Kwa ve ark. (114) benzimidazollere karşı dirençliliğin β tubulin genindeki bir mutasyondan kaynaklandığını göstermiştir. *H. contortus*'taki bu mutasyon tek nükleotit polimorfizmi olarak isimlendirilmektedir. Benzimidazoller β tubulin proteinlerine bağlanmakta ve mikrotubullerin yapısını bozmaktadır. Benzimidazol duyarlı *H. contortus* suşlarında β-tubulin izotip 1 geninde 200. kodonda Phe/Phe (TTC/TTC), 167. kodonda (Phe/Phe [TTC/TTC]) ve 198. kodonda (Glu/Glu [GAA/GAA]) amino asitleri bulunmakta iken dirençli suşlarda ise 200. kodonda ve yabani tip 167. ve 198. kodonlarda Tyr/Tyr (TAC/TAC) amino asiti bulunmaktadır (115). Nematodlarda (*H. contortus, Teladorsagia circumcincta* ve cyathostomelarda) 198 ve 200. kodonlar yabanıl tip olduğunda dirençlilik 167. kodonda (TAC/TAC) gerçekleşmektedir (116-118). 198. kodonda meydana gelen 3.mutasyonda

duyarlı parazitlerde Glu/Glu (GAA/GAA) amino asiti bulunurken dirençlilerde Ala/Ala (GCA/GCA) amino asiti bulunmaktadır. Benzimidazol dirençli *H. contortus* suşlarında β tubulin izotip 1 geninde 200. kodonda bulunan fenil alaninin (TTC kodonu) tirozine (TAC kodonu) dönüşümü olmaktadır. Son zamanlarda 167 ve 198. kodonlardaki iki yeni mutasyonunda benzimidazoller ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (117, 119).

Bezimidazol duyarlı parazitlerde TTC kodonu, β tubulin izotip 1 proteininde 200 ve 167. pozisyondaki fenil alaninini kodlamaktadır. Benzimidazol dirençli parazitler TAC kodonuna sahiptirler ve bu kodon β tubulin izotip 1 geninde ya 167 ya da 200. kodonda Tirozini kodlamaktadır. Bununla birlikte 200. kodondaki mutasyon çoğunlukla benzimidazol dirençliliği ile ilişkilidir. 167 ve 200. kodonlarda meydana gelen her iki mutasyonda resesiftir (120-122).

H. contortus'ta levamisole karşı dirençlilik, vücut kasları üzerinde bulunan nikotinik asetilkolin reseptörünün sayısının ya da bu reseptörlerin ilaca afinitesinin azalması gibi değişimlere bağlıdır. Nikotinik asetilkolin reseptörü kas dokusu boyunca sodyum, potasyum ve kalsiyumun taşınımı için gereklidir. Bu reseptör merkezi iyon kanallarının etrafında düzenlenmiş 5 alt birimden (2α, 1β, 1γ ve 1δ) oluşmaktadır. Normal şartlarda iyon kanalları kapalıdır, ancak levamisol gibi bağlayıcı ligantlar bulunduğunda bu kanallar açılabilmektedir. Kanalların bu şekilde açılması iyonların geçişine izin vermekte ve böylece parazitin paralizine ve kas kasılmasına sebep olmaktadır. Asetilkolin reseptöründeki bu değişimler levamisole az sayıda reseptörün bağlanmasına veya açılan kanalları önleyebilecek reseptörlerin duyarlılığında azalmaya neden olmaktadır. Büyük levamisole molekülleri ile olan bu değişimler sonucunda iyon kanalları bloke olmakta veya tamamen kapanmaktadır (123-125).

Makrosiklik lakton dirençliliğini içeren mekanizma henüz tam olarak bilinmemektedir. Blackhall ve ark. (126) yaptıkları çalışmalarda ivermektine dirençli GluCl geninin değişimine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Glutamat girişli klorid kanalları asetil kolin reseptörleri gibi iyon kanallarının etrafında düzenlenmiş 5 alt üniteden (α ve β) oluşmaktadır (123, 127). α alt ünitesi glutamat'ın bağlanacağı, β alt ünitesi ise ivermektinin bağlanacağı bölgeleri içermektedir (123). α-subunitin tek bir alelindeki seleksiyon *H. contortus'*a dirençli suşlarda daha sık bulunmaktadır (128). Bu allellerin seleksiyonu sonucu oluşan mutasyonda, ilaç bağlanması ile konformasyonel değişiklikler olabilmekte veya kendisine bağlanmasını inhibe edememektedir (113). γ-aminobutyric acid (GABA) reseptör geni, makrosiklik lakton dirençliliğinde bir mekanizma olarak gösterilmiştir. γ-aminobutyric acid (GABA) reseptör

geninin fonksiyonu GluCl genine benzerdir (128). Makrosiklik laktonlara dirençlilik olarak bilinen bu mekanizma P-glikoproteinlerin (Pgp) detoksifikasyon sürecidir. P-glikoproteinler ilaçları ve taşıma bileşiklerini membrandan taşıyan akışkan taşıyıcılardır. Pgp'ler sindirim sistemi ile sınırlandırılmışlardır ve faringeal ve bağırsak hücreleri membranları üzerinde yüksek oranda ifade edilmişlerdir. Pgp'nin nematodlardaki işlevi tam olarak bilinmemekte, ancak antihelmintiklere geniş oranda bağlanma yeteneğindedir ve böylece organizmayı toksik maddelere karşı koruyabilmektedir. P-glikoproteinler yüksek oranda korunmuş trans membran proteinleridir. Bu proteinler, *H. contortus*'ta identifiye edilmiştir ve cDNA sekansı ile elde edilmiştir. *H. contortus*'ta Pgp'yi kodlayan en az 7 gen bulunmaktadır (129,130).

H. contortus'ta antihelmintiklerin her sınıfına karşı bir direnç geliştiği için ortak bir dirençlilik mekanizmasından söz edile bilinmektedir. *H. contortus*'taki antihelmintik dirençliliğinin Pgp'nin ekspresyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Benzimidazoller, levamisol ve ivermektin ortak Pgp sustratlarıdırlar. *H. contortus*'un benzimidazol ve ivermektin dirençli suşlarında duyarlı suşlardan daha yoğun Pgp allelleri bulunduğu tespit edilmiştir. Benzimidazoller kullanıldığında Pgp hedef bölgelerde bu ilacın konsantrasyonunu ayarlayabilmektedir. Pgp ve benzimidazol dirençliliği arasındaki ilişki Pgp'nin inhibitörü Verapamil'in kullanılması ile gösterilmiştir. Verapamil kalsiyum kanallarını bloke etmektedir. Verapamil bir antihelmintik ile verildiğinde ilacın akışını azaltmaktadır. Deneysel çalışmalar ile verapamil varlığında ilaçların toksisitesinin artttığı ve benzimidazol dirençliliğinin tersine döndüğü saptanmıştır (131, 132).

Makrosiklik lakton dirençliliğinde (özellikle ivermektin) Pgp'nin rolü çok iyi bilinmektedir. İvermektin nematodlarda Pgp'nin bir substratı olarak tanımlanmıştır. Pgp'nin oranı ivermektin dirençli *H. contortus* suşlarında duyarlı suşlardan daha yüksek oranda bulunmaktadır. *H. contortus*'un ivermektin dirençli suşlarına verapamil verildiğinde ivermektinin etkisinin arttığı gözlenmiştir (131, 132).

Levamisol dirençliliğinde Pgp'nin rolü tam olarak bilinmemektedir. Ancak levamisolünde ivermektin gibi Pgp'nin bir substratı olarak çalıştığı düşünülmektedir (131, 132).

2.2.9 Antihelmintik Dirençliliğinin Belirlenmesi

Antihelmintik dirençliliğinin belirlenmesinde çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Günümüzde parazitolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemler direnç belirleme çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Dirençliliğin belirlenmesinde kullanılan testler 2 grup altında

toplanmaktadır. Bunlar in vivo ve in vitro testlerdir. Dirençliliğin belirlenmesinde en çok kullanılan 2 in vivo test bulunmaktadır: Fecal egg count reduction test (FECRT) ve Kontrol antihelmintik testi (CET). Bugüne kadar antihelmintik dirençliliğinin belirlenmesinde çeşitli in vitro testler geliştirilmiş ve sığırların gastrointestinal nematodlarının antihelmintik dirençliliğinin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. In vitro testler içerisinde, egg hatch assay (EHA), Larval paraliz ve larval motilite testi, ergin gelişim testi, larva beslenmesini önleme testi (LFIA), biyokimyasal testler, moleküler/genetik testler ve larva gelişim testi (LDA) bulunmaktadır. In vitro testler tam ve daha kesin sonuçlar vermekte ve in vivo testlere göre daha ekonomik olduklarından dirençlilik belirleme çalışmalarında daha sık kullanılmaktadırlar. Ancak in vitro testlerin hepsi bütün antihelmintik ilaçların dirençliliğinin belirlenmesinde kullanılamamaktadır (133, 136).

2.2.9.1 In vivo Teknikler

2.2.9.1.1 *Dışkıda yumurta azalım testi [Fecal egg count reduction (FECRT)]:* Nematodlarda antihelmintik direnç belirleme çalışmalarında en yaygın kullanılan testtir. Bu test bütün antihelmintik sınıflarının direnç belirlenmesinde kullanılmaktadır. Testte antihelmintik tedavisi öncesi ve sonrasında dışkı ile atılan yumurta sayısı modifiye McMaster tekniği kullanılarak karşılaştırılmakta ve böylece antihelmintiklerin etkinliği belirlenebilmektedir. Ancak FECRT testi, tedaviden etkilenmeyen olgunlaşmamış larvaların gelişiminden dolayı levamisol dirençliliğinde bazen yanlış sonuçlar verebilmektedir. Strongil tip yumurta üreten çeşitli nematod türlerinde yumurtaları morfolojik olarak birbirinden ayırt etmek zor olmaktadır. Bu nematodlar aynı zamanda çok çeşitli yumurtlama kapasitesine sahiptirler ve hatta aynı cins içerisinde de farklılıklar görülmektedir. Yumurtalama kapasitesindeki bu farklılık FECR testinde yanlış sonuçlar verebilmektedir. Düşük maliyetli olması ve daha az işçilik gerektirmesi nedeniyle dirençliliğin belirlenmesinde çok kullanılmaktadır. Yöntemin dezavantajı ise dışkı ile atılan yumurta sayısının parazit yükü ile ilişkili olmamasıdır (137-139).

2.2.9.1.2 *Kontrol etkinlik testi (CET):* Bu test gold standart bir testtir ve testte tedavi edilen ve edilmeyen hayvanlarda parazit sayısı karşılaştırılarak antihelmintiklerin etkisi belirlenmektedir. Temel olarak nematodların dirençli ve duyarlı izolatları ile doğal enfekte hayvanlarda parazit yükü karşılaştırılmaktadır. Hayvanlar yaklaşık 21-28 gün L3 ile enfekte edilmekte ve daha sonra antihelmintiklerle tedavileri yapılmaktadır. Enfekte hayvanlar ilaç verilen ve verilmeyen şeklinde gruplara ayrılmakta ve tedaviden sonra (10-14 gün)

nekropsileri yapılarak parazitler makroskopik olarak identifiye edilmekte ve sayılmaktadır. Bu testin çalışma grubunda yer alan hayvanlarda tedavi öncesi ve sonrası parazit sayısının karşılaştırılabilmesi için nekropsilerinin yapılmasının gerekmesi testin dezavantajı arasında bulunmaktadır. Bu nedenle test yaygın bir şekilde kullanılmamaktadır (140).

2.2.9.2 In vitro Teknikler

2.2.9.2.1 *Yumurtadan çıkış testi [Egg hatch assay (EHA)]:* Ruminantlarda, antihelmintik dirençliliğin belirlenmesinde kullanılan in vitro testlerden birisidir ve uzun yıllar rutin bir şekilde kullanılmıştır. Bu testte benzimidazol ve levamisol dirençliliği belirlenirken, avermektin ve closantel direçliliği belirlenememektedir. Hayvanlara benzimidazol ve levamisol tedavisi uygulandığında, gastrointestinal nematodların duyarlı ve dirençli suşları arasındaki farklılığın belirlenmesi için geliştirilmiştir. Birden çok nematod türü bulunan popülasyonlarda duyarlılığın belirlenmesinde FECRT testine göre daha ekonomik ve hızlı karşılaştırma olanağı sağlamaktadır. Bu testte dirençliliğinin belirlenebilmesi için dışkı taze olmalı ve hayvandan alındıktan sonra 3 saat içerisinde incelenmelidir. Bu nedenle saha çalışmalarında pek kullanılmamaktadır (136).

2.2.9.2.2 *Larval paraliz ve motilite testi***:** Levamisol ve morantel dirençliliğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Larva kültürü ile toplanan 3. dönem larvalara levamisol ve morantelin seri dilisyonlar şeklinde 24 saat inkübasyonundan sonra, larvalar 100X büyütmeli mikroskopta incelenerek normal ve paralize olanlar ayırt edilmiş ve böylece parazitlerin dirençli ve duyarlı suşları tespit edilebilmiştir. Bu testte ilacın uygulama süresi önem taşımaktadır. Antihelmintik çok erken uygulanırsa larvaların gelişimi tamamlanmamakta, eğer çok geç uygulanırsa da larvalara karşı herhangi bir etki göstermemektedir. Test üzerinde çeşitli modifikasyonlar yapılarak levamisol ve benzimidazol ile inkübasyondan sonra ergin nematod ve larvaların hareketlerini belirlemek için mikro-motilite ölçümleri geliştirilmiştir (135).

2.2.9.2.3 *Tubulin bağlanma testi:* Bu test ilaçların etki mekanizmasına dayanmaktadır. Benzimidazol dirençliliği antihelmintiklerin tubuline bağlanma afinitesinin azalmasına bağlıdır. Duyarlı ve dirençli nematodların hücre içi proteini olan tubuline benzimidazoller farklı bağlanmaktadır. Test, toz haline getirilen ve tritium ile işaretlenen benzimidazolün enfektif yumurta, larva ve ergin parazitlerden elde edilen tubulin ile inkübasyon sürecini içermektedir. İnkübasyondan sonra serbest, tubuline bağlanmamış ilaçlar körük ile ortadan kaldırılmakta ve tubuline bağlananlar ise sıvı sentilasyon spektrofotometrisi ile sayılmaktadır.

Dirençli parazitlerden elde edilen tubulin ekstraktları, duyarlı olanlardan daha zayıf bir şekilde bağlanmaktadır. Test hızlı, sağlam ve parazit popülasyonlarında dirençli suşlardaki küçük değişimlere duyarlı olmakla birlikte çok sayıda larva gerektirmesi nedeni ile saha çalışmalarına uygun bir test değildir (135, 141).

2.2.9.2.4 *Larval gelişim testi (LDA):* Test bütün ilaçlara karşı direnç belirleyen testlerden birisidir. LDA sığırlarınların büyük gastrointestinal parazitleri olan *H. contortus*'ya karşı milbemisin, avermektin, levamisol, benzimidazol kombinasyonları ve benzimidazol dirençliliğini belirlemektedir. Bu testte hasta hayvanların dışkısından izole edilen yumurtalar antihelmintik bulunan mikro-plate kuyucuklarına konularak L3'lerin gelişmesi sağlanmaktadır ve böylece uygulanan antihelmintiğin konsanrasyonunun L3 gelişimini bloke etmesine bakılmaktadır (142).

2.2.9.2.5 *Ergin gelişim testi:* Enfekte hayvanların dışkıları ile atılan yumurtaların kültürü yapılması ve ergin dönemlerin incelenmesi esasına dayanmaktadır. Nematodlarda dirençliliğin belirlenmesi için kullanılan bu testin gelişiminde çok küçük ilerlemeler kaydedilmiştir ve kültür tekniğinin zorluğundan dolayı çoğu zaman uygulamada başarısız olunmuştur (143).

2.2.9.2.6 *Biyokimyasal analizler:* Biyokimyasal araçlar kullanılarak da direnç belirlenmektedir. Günümüzde bu test yalnızca benzimidazol dirençliliğini belirlemek için kullanılmaktadır. Bu konudaki araştırmalar, benzimidazol dirençli suşlarda, benzimidazolün tubuline bağlanma afinitesindeki azalma üzerine odaklanmıştır. Tritium işaretli benzimidazolün tubuline bağlanması ile elde edilen tubulin ekstraktının inkübasyonunu içermektedir. Tubuline bağlanmayan ilaçlar körük ile uzaklaştırılmakta ve tritium işaretli olanlar sıvı sentilasyon aleti ile hesaplanmaktadır. Testin hızlı, sağlam, tekrarlanabilir ve duyarlılığının yüksek olması avantajları arasında yer alırken, çalışmada çok sayıda larvanın kullanılması, laboratuvar araçlarının pahalı olması ve deneyimli elemanların bulunmaması ise dezavantajları arasındadır (143).

2.2.9.2.7 *Moleküler/Genetik testler:* Antihelmintik dirençliliğin belirlenmesinde moleküler teknikler, konvansiyonel yöntemlerdeki kısıtlamaların üstesinden gelecek fırsatlar sunmaktadır. Günümüzde ruminantların gastrointestinal nematodlarının evrimsel ve filogenetik ilişkilerinin araştırılmasında çeşitli nükleer, ribozomal ve mitokondrial gen bölgeleri çalışılmıştır. Ribozomal gen bölgeleri için 18S small subunit, 5.8S ve 28S gibi large

subunit, ITS-1 ve ITS-2 gibi non fonksiyonel gen bölgeleri; mitokondriyal gen bölgeleri için ise NAD4 ve COI gibi gen bölgeleri filogenetik ilişkilerin incelenmesinde tercih edilen gen bölgeleri olmuştur. *H. contortus*'un benzimidazol dirençli ve duyarlı suşlarını belirlemede RFLP ve alel spesifik PCR gibi çeşitli moleküler teknikler kullanılmaktadır. Bu yöntemler duyarlı olmalarına karşın standartizasyonları zordur ve kantitasyona olanak vermemektedir. Bu nedenle birçok trichostrongil DNA'sının kantitatif analizi için kolay, hızlı ve güvenilir metodlar geliştirilmiştir. Son zamanlarda küçük ruminantların *Trichostrongil* enfeksiyonlarında benzimidazol direncini belirlemeye yönelik real-time PCR tekniği kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknikte floresan işaretli problar kullanılarak PCR çoğaltımını görünür hale getirmekte ve birden fazla paraziti kantitatif olarak eş zamanlı tespit etmesiyle oldukça spesifik bilgiler sağlamaktadır. Real-time PCR testi nematodlarda β tubulin izotip 1 geninin 200. kodonundaki duyarlı ve dirençli allelleri tespit edebilmektedir. Bu amaçla çeşitli Taqman probları kullanılmakta ve tek nükleotit polimorfizmi belirlenebilmektedir. Real-time PCR tekniği, hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle son yıllarda çok kullanılan tekniklerin başında gelmektedir. Söz konusu teknik ile doğal enfekte sığırlarda sürü bazında benzimidazol dirençliliği kantitatif olarak belirlenebilmekte ve risk potansiyelleri ortaya konabilmektedir (144-155).

2.2.10 Korunma ve Kontrol

Nematodların kontrolünde kimyasal kontrol yöntemlerine alternatif olarak çeşitli doğal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler içerisinde hayvanları tanenden zengin besinlerle besleme, bakteri ve mantarların kullanımı, besin takviyesi, bakır (copper oxide wire particles-COWP) kullanımı ve antihelmintik özelliği gösteren çeşitli bitkilerin kullanımı bulunmaktadır (156).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırma Sahası ve Sığır Dışkı Örnekleri

Çalışma, 113 O 597 kod numaralı ve "İç Anadolu Yöresinde Sığır Coccidiosis'ine Yol Açan Patojen *Eimeria* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Teşhiste Türe Özgü Real Time PCR Tekniğinin Geliştirilmesi" başlıklı TÜBİTAK projesi kapsamında 2013-2015 yılları arasında örneklenen İç Anadolu Bölgesi'nin Kayseri, Nevşehir, Yozgat ve Kırşehir illerindeki halk elinde yetiştiriciliği yapılan çeşitli sığırcılık işletmelerindeki farklı yaş, cinsiyet ve ırklara ait sığırlar üzerinde yürütülmüştür. İlgili proje kapsamında dışkı örneklemesi yapılan sığırların illere ve çeşitli faktörlere göre dağılımları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 İç Anadolu yöresinde örneklenen sığırların yaş, cinsiyet ve ırklarına göre dağılımları

Araştırma Yöresi	**Sığır sayısı**										
	Yaş			**Cinsiyet**		**Irk**					**Toplam**
	≤3 ay	4-12 ay	>12 ay	Erkek	Dişi	Holstein	Simental	Montofon	Yerli	Melez	
Kayseri	50	132	172	135	219	97	91	85	48	33	354
Nevşehir	26	53	102	73	108	48	45	44	33	11	181
Yozgat	25	50	115	72	118	56	46	39	30	19	190
Kırşehir	22	58	115	85	110	47	50	48	38	12	195
Toplam	123	293	504	365	555	248	232	216	149	75	920

3.2 Konvansiyonel Dışkı Muayenesi

Laboratuvara getirilen örnekler trichostrongylid yumurtaları yönünden analize tabii tutulmuştur. Dışkı örneklerinden 3 gr tartılmış doymuş şekerli su (Sheather's sugar solution) (spesifik gravite: 1,27) (157) ile homojen hale getirilerek steril gazlı bezler yardımıyla 50ml falcon tüplerine süzülmüştür. Tüpler üzerine lamel kapatılarak 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş sonrasında oda ısısında 5 dk beklenerek lameller lam üzerine alınıp ışık mikroskobunda yumurtalar yönünden incelenmiştir. İnceleme esnasında tüpler üzerine tekrar

lamel kapatılarak 5-10 dk beklenmiş ve akabinde ikinci lamel de incelemeye tabii tutulmuştur.

3.3 Gram Dışkıdaki Yumurta Sayısının (EPG) Belirlenmesi

Gram dışkıdaki yumurta sayısının (EPG) belirlenmesinde Velkers ve ark. (158) tarafından bildirilen prosedür modifiye edilerek kullanılmıştır. Buna göre; 3 gr dışkı örneği tartılarak içerisinde 42 ml çeşme suyu konulan dışkı kabına alındı (1 gr dışkı 14ml çeşme suyu hesabı). Homojen olana dek bir bagetle karıştırıldı. 10dk da bir karıştırarak 30dk oda ısısında bekletildi. Süre sonunda tekrar bagetle karıştırıp bekletmeden diğer temiz bir dışkı kabına tek katlı sargı bezi kullanılarak süzüldü. Sonrasında beklemeden kaptaki süspansiyondan 15ml santrifüj tüpünün 10ml çizgisine kadar doldurulup ağzı kapatıldı.Sonra tüpler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda sedimenti oynatmadan 10 ml disposible pipetle süpernatant atıldı. Sediment üzerine 4ml çizgisine kadar flotasyon solüsyonu ilave edip 1000 µl pipet ile homojen hale getirilip, hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi. Hiç bekletmeden aynı pipet ucu ile McMaster lamının 2 kamerası doldurulup 5 dk inkubasyondan sonra mikroskop altında 10X büyütmede sayım yapıldı. Her iki kameradaki çizgili diktörtgen alanlar içindeki yumurtalar ayrı ayrı sayılarak ve toplamı alındı. Çizgili alan dışındaki yumurtalar sayılmadı, çizgi üzerine gelmiş yumurtaların ise 1/2'si alan içinde sayıldı. İki kameradaki toplam yumurta sayısı 20 ile çarpılıp EPG değeri bulundu.

<u>Hesaplama ayrıntısı:</u>

McMaster bölmesinin üst ve alt camları arasındaki mesafe 0.15 cm olup iki sayım alanının her biri 1x1 cm'dir. Bu nedenle, iki sayım alanı altındaki dışkı süspansiyonu, 2x0.15ml = 0,3ml hacimdedir. Test tüpündeki son fekal süspansiyonun 4 ml'si 2/3 g dışkıları temsil eder ve bu nedenle 0.3 ml dışkı süspansiyonunun sayılan hacmini 1/20 g dışkı oluşturur. Gram dışkıdaki yumurta sayısı chamberın iki tarafındaki toplam yumurtaların 20 ile çarpılmasıyla hesaplandı.Sonuçlar kayıt defterine geçirildi.

3.4 Larval Kültür

Yumurta pozitif örnekler EPG sayıları temelinde 3. dönem enfektif larvaların elde edilmesi için kültüre edildi. Pozitif olarak belirlenen dışkı örnekleri kültür amacıyla uygun şartlarda 26°C-28°C'de etüv içerisinde 7-10 gün inkübe edilerek gelişen 3. dönem enfektif larvalar

(L3) Baermann tekniği ile toplandı. Toplanan larvaların uygun teşhis anahtarları (159) ile teşhisleri yapılıp görüntüleri kaydedildi.

3.5 Trichostrongylid Pozitif Örneklerden Çoklu DNA İzolasyonu

3.5.1 Yumurta İzolasyonu

Dışkı örneğinden karıştırıldıktan sonra 4gr tartılarak içerisinde 42ml distile su olan steril dışkı kabına aktarıldı. Steril baget ile homojen olana dek karıştırıldıktan sonra steril gazlı bez ile steril cam huni yardımıyla 50ml falcon tüpe süzülerek üzerine 50ml olacak şekilde steril distile su eklendi. 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda 2ml sediment bırakılarak süpernatant dikkatlice atıldı. 2ml çöküntü üzerine tekrar 50 ml olacak şekilde steril distile su eklenerek 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda 2ml bırakılarak süpernatant dikkatlice atıldı. 2 ml çöküntü 15ml santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 15ml tamamlayacak şekilde doymuş şekerli su eklenerek kapağı kapatılıp 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüpler üzerinde şekerli su ile bombe oluşturulup üzerine taşırmayacak şekilde lamel kapatıldı. Tüpler 10dk oda ısısında bekletilip süre sonunda lamel alınarak steril distile su ile her defasında 100ul olacak şekilde 2ml microsantrifüj tüpüne yıkandı. Tüpler üzerine tekrar lamel kapatılarak aynı işlem tekrarlandı. Aynı tüp üzerinden 1000 µl pipet ucu kullanılarak 2ml alınıp yeni steril 15ml plastik tüpe aktarıldı. Üzeri 15ml çizgisine kadar steril deiyonize su ile tamamlanıp 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süre sonunda süpernatant atılıp dipte bırakılarak 0,5ml sediment pipetle aynı 2ml santrifüj tüpüne aktarıladı. Tüplerin üzeri 2ml tamamlandıktan sonra 10.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Dipte 50-100 µl sedimet kalacak şekilde süpernatant atılarak tüplerin üzeri tekrar 2ml tamamlandıktan sonra 10.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Dipte 50-100 µl sediment kalacak şekilde tüpten 10µl alınarak yumurta sayımı yapıldı.

3.5.2 Larva İzolasyonu

Baerman tekniği ile elde edilmiş larval süspansiyon 2ml ependorf tüpüne aktarıldıktan sonra 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek, süpernatant atılıp sediment üzerine deiyonize su eklenip tekrar aynı koşularda santrifüj edildi. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı. Dipte 100 µl sediment kalacak şekilde tüpten 10µl alınarak larva sayımı yapıldı. Larva sayıları kayıt edildi.

3.5.3 Genomik DNA İzolasyonu

Yumurta ve larva süspansiyonlarından genomik DNA izolasyonunda Lalonde ve Gajadhar (160) tarafından bildirilen teknik modifiye edilerek kullanılmıştır. Yumurta ve larva süspansiyonları birer dakika olmak üzere 8 siklus sıvı azot ve kaynar suda tutularak yumurta ve larvaların parçalanması sağlanmıştır. Sonrasında tüpler 0,5 mm glass beads ile 5 dk homojenizatörde (Tissue Lyser LT; Qiagen) mekanik parçalanmaya tabii tutulmuştur. Daha sonra süspansiyon genomik DNA ekstraksiyon kitleri (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific; QIAamp DNA Micro Kit, Qiagen) ile DNA ekstraksiyonuna basamaklar modifiye edilerek alınmıştır. Final basamakta elüsyon 30 µl'ye ayarlanmıştır. Elde edilen genomik DNA ekstraktlarından alınan örnekler Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek DNA izolasyon etkinliği ve total genomik DNA miktarları (ng/µl) belirlenmiştir. Örneklere ait genomik DNA'lar kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.6 Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I (Mt-COI) Geninin Amplifikasyonu

Yumurta ve larva süspansiyonlarından izole edilmiş genomik DNA ekstraktları mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mt-COI) geninin 402 bp parsiyel kısmını amplifiye eden primerlerle Nested PCR analizlerine tabii tutulmuştur (161). Birinci PCR basamağında Nemat-F (5'-CCTACTATAATTGGTGGGTTTGGTAA-3') forward ve Nemat-R (5'-TAGCCGCAGTAAAATAAGCACG-3') reverse primerleri, ikinci PCR basamağında ise COI-N2F (5'-GATTCDTGTTTTGTTGATAYGGG-3') forward ve COI-N2R (5'-TAAA ATTAAAATATACACTTCAGGGTG-3') reverse primerleri kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmış ve Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) içerisinde 10-20 ng template DNA içerecek şekilde final miks hazırlanmıştır. Thermalcyclerda her iki PCR için de protokol ön denatürasyon: 94°C'de 2 dk; 35 siklus, denatürasyon: 94°C'de 30 s, bağlanma: 50°C'de 30 s, uzama: 72°C'de 1 dk; final uzama: 72°C'de 10 dk olarak ayarlanmıştır. PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak Anabilim Dalında mevcut referens DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektoforeze tabi tutularak, CLP Jel

Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.7 Real Time PCR Analizleri

Mt-COI gen bölgesi nested PCR analizleri temelinde pozitif belirlenen izolatlarda *O. ostertagi* ve *H. contortus* DNA'larının belirlenmesi amacıyla ilgili gen bölgesinden Sybergreen Real Time PCR için tür spesifik primer dizaynı yapılmıştır. Primer dizaynı ve spesifite analizleri Geneious 10.1.2 yazılımı (162) üzerinden gerçekleştirilmiştir. Primer spesifik bağlanmaları GenBank üzerinden primer blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) analizleri ile konfirme edilmiştir. *O. ostertagi* ve *H. contortus* özgü belirlenen primer dizileri, amplikon büyüklükleri ve Tm değerleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2 *O. ostertagi* ve *H. contortus* mt-COI gen bölgesinden dizayn edilen Sybergreen Real Time PCR primerleri ve özellikleri

Tür	Primer	TM	Amplikon büyüklüğü
O. ostertagi	OsterFSybr 5'- CCCGGGTAGAAGTGTTGATTT-3'	59,4	111 bp
	OsterRSybr 5'- GAACTACTRCGCAAATTCTTRG-3'	59,6	
H. contortus	HconFSybr 5'- GGCGGGAACAAGTTGAACAGT-3'	61,3	115 bp
	HconRSybr 5'- CCCTAAAATTGATCTTAAACCC-3'	56,6	

Real Time PCR testinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla, Anabilim Dalında mevcut referens DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Real Time PCR analizleri CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System'de (BioRad) gerçekleştirilmiştir. PCR master mix (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, BioRad) üreticinin açıklamalarına göre toplam 20 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır ve kit prosedüründe belirtilen termal profil uygulanmıştır.

2X Master Mix	10 µl
Forward primer (20 µM)	0,5 µl
Reverse primer (20 µM)	0,5 µl

Genomik DNA (50 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	8 µl

Testin spesifitesi miks türlere ait örneklerden elde edilmiş genomik DNA izolatları ile O. *ostertagia* ve *H. contortus* türlerine ait izolatlardan elde edilmiş mt-COI gen bölgesini ihitiva eden plazmid DNA'ların kullanılmasıyla test edilmiştir. Sensitivite hesaplanmasında Xbal ve Aval enzimleri ile hedef gen bölgesini ihtiva eden plazmid DNA'lar linearize edilerek agaroz jelden pürifiye edildikten sonra Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında µg/ml düzeyinde konsantrasyonları ölçülerek kaydedilmiştir. Daha sonra molar konsantrasyon düzeyinde linearize edilmiş plazmidlerin mikrolitersindeki DNA kopya sayısı belirlenmiş ve 1 µl template için 10^7-10^1 hedef kopya olacak şekilde 10 tabanında dilüsyonları hazırlanmıştır. Dilüsyonlar iki tekrarlı çalışılmış ve Ct değerlerine göre standart eğriler oluşturulmuştur. Testin etkinliği (E) standart eğri slopuna göre E = (10-1/slope (-1) CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System'de (BioRad) ilgili yazılım ile hesaplanmış ve yüzde olarak ifade edilmiştir (163). Real Time PCR analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler, amplifikasyon eğrileri ve Ct (dR) (Eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

3.8 *O. ostertagia* ve *H. contortus* İzolatlarının Mt-COI Gen Bölgesi Klonlaması ve Plazmid DNA İzolasyonu

3.8.1 Yumurta ve Larva Süspansiyonlarından Elde Edilmiş Genomik DNA'larda Sybergreen Real Time PCR ile *O. ostertagia* ve *H. contortus* Pozitif İzolatların Belirlenmesi

Trichostrongylid yumurtaları ile pozitif belirlenen örneklerden izole edilen yumurta ve larva (L3) süspansiyonlarından elde edilen ve mt-COI gen bölgesi Nested PCR analizleri ile etkinliği ortaya konan genomik DNA'larda O. *ostertagia* ve *H. contortus* DNA'larının varlığı geliştirilen sybergreen real time PCR tekniği ile belirlenmiştir. Her iki tür için belirlenen Ct (dR) verilerine göre sekans analizleri için uygun izolatlar ayrılmıştır.

3.8.2 *O. ostertagia* ve *H. contortus* Pozitif İzolatlarda Mt-COI Geninin Amplifikasyonu ve Pürifikasyonu

O. ostertagia ve *H. contortus* yönünden sybergreen real time PCR tekniği ile pozitif belirlenen ve Ct (dR) verilerine göre uygun konsantrasyonda olan izolatların mt-COI gen

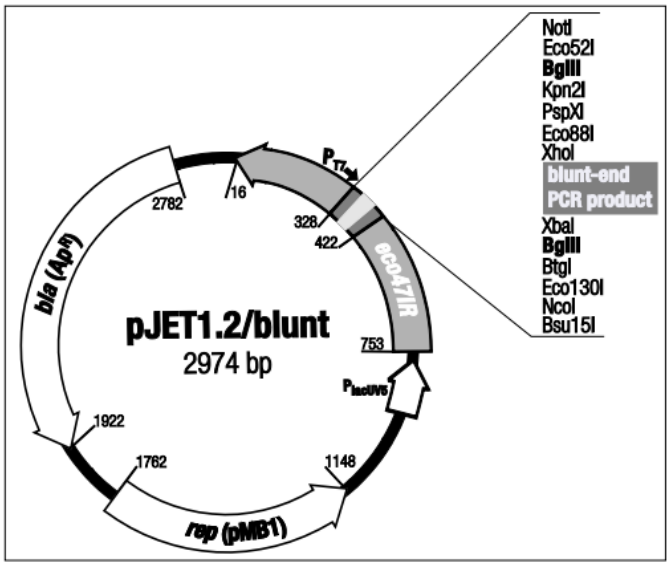
bölgeleri madde 3.6'da verilen primerler ve Nested PCR prosedürüne göre amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektoforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir. PCR ürünleri agaroz jel üzerinden High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak pürifiye edilmiştir.

3.8.3 Mt-COI Gen Bölgelesinin Klonlanması ve Plazmid DNA İzolasyonu

O. ostertagia ve *H. contortus* türlerinin varlığı yönüden pozitif belirlenen izolatların jel pürifiye amplikonları sekans ve filogenetik analizler amacıyla klonlama ve plazmid pürifikasyon işlemlerine tabii tutulmuştur. Jel pürifiye örneklerin klonlanmasında CloneJET PCR Clonning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyonu üreticinin açıklamaları doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

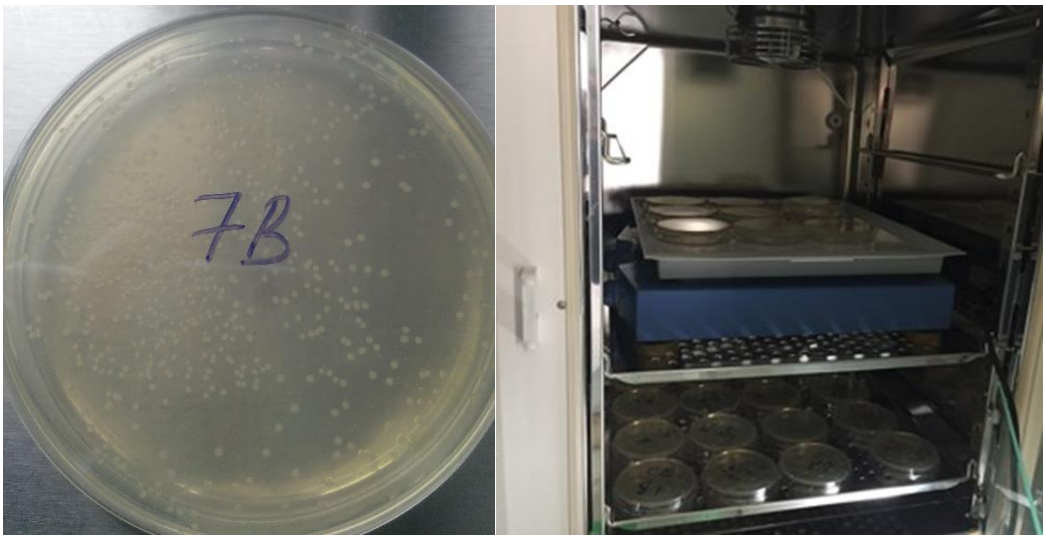
2X Reaction Buffer	10 µl
PCR product	1-5 µl (~10ng/µl)
Nuclease free water	17 µl'ye kadar
DNA Blunting Enzyme	1 µl
Toplam	18 µl

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 25 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 µl'si transformasyon için kullanılmıştır. pJET1.2/blunt Cloning Vector haritası Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 pJET1.2/blunt cloning vector haritası

Klonlama prosedürünün transformasyon basamağında 5 µL'lik ligasyon ürünü buz üzerinde tutulan *E. coli* TOP 10 hücreleri üzerine eklenmiş ve buz üzerinde 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Sonra hücreler önce 42°C'de 2 dk daha sonra buz üzerinde 4 dk bekletildikten sonra üzerine 250 µL SOC Medium eklenmiştir. 37°C'de çalkalayıcı üzerinde 1,5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı uygun konsantrasyonda ampicilin ihtiva eden LB (Lurie-Bertani) katı besi yerine ekilerek kolonilerin gelişimi için bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir. LB katı besi yerinde üreyen kolonilerden (Şekil 3.2) steril pipet uçları ile alınarak işaretlenmiş LB katı besi yeri içeren pleytler üzerine koloniler (her pleyt dörde bölünerek her bölmeye bir koloni geçilmiştir) tekrar ekilerek 37°C'de 1 gece daha inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.2 LB katı besi yerinde üreyen koloniler

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin *O. ostertagia* ve *H. contortus* mt-COI gen bölgesini ihtiva eden rekombinant plazmidi içerip içermediğini anlamak için aynı koloniye ait her bir işaretlenmiş bölgeden tek bir koloni seçilerek madde 3.7'deki prosedüre göre spesifik sybergreen real time PCR analizleri yapılmıştır. Real time PCR analizlerine göre kolonilerde vektör + *O. ostertagia* ve *H. contortus* mt-COI gen bölgesi insert varlığı konfirmasyonu sağlanmıştır.

Vektör+insert varlığı yönünden konfirme edilen kolonilerden (İşaretlenmiş pleytlerde aynı bölmede bulunan koloniler) en az iki adedi seçilerek steril özeler ile alınmış ve uygun konsantrasyonda ampicilin ihtiva eden 5 ml hacimde LB sıvı besi yerlerine ekimleri yapılarak 37°C'de çalkalayıcı üzerinde bir gece inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.3).

Şekil 3.3 Kolonilerin LB sıvı besi yerinde üretilmesi

Sıvı besi yerinde üretilen hücrelerden 2 ml alınarak 8000 rpm'de 2 dk santrifüj işlemine tabii tutulmuş ve hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım dökülüp hücresel pelet GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) ile plazmid pürifikasyonuna alınmış, aynı örneklere ait diğer bir kısım hücresel pelletler ihtiyaç halinde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza altına alınmıştır. Elde edilen plazmidler insertlerin varlığı yönünden vektör spesifik pJET1.2 forward ve pJET1.2 reverse primerleri ile prosedürüne uygun olarak PCR'da analize tabi tutulmuştur.

3.9 Mt-COI Gen Bölgelerinin Sekans ve Filogenetik Analizi

İlgili gen bölgesi için elde edilmiş olan plazmid DNA'lar pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 10.1.2 (162) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin pairwise alignmentları yapılarak, vektör DNA'sı ile kıyaslanmış, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlemiş ve izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) analizleri yapıldıktan sonra GenBank'ta mevcut homolog izolatlara ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla Geneious 10.1.2 (162) yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid farklılıkları belirlenmiştir. Filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde Bayesian analizleri (BA) uygulanmıştır. BA analizlerinde sekans evrimi için en uygun modelin belirlenmesinde jModelTest 2 (164) kullanılmış ve en düşük Akaike Bilgi Kriteri (AIC) değerine sahip General Time Reversible + Gamma distributed inv (GTR+G+I) modeli filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılmıştır. Bayesian analizleri Geneious 10.1.2 (162) yazılımı üzerinden MrBayes plugin (165) kullanılarak gerçekleştirilmiş, Markov Chain Monte Carlo taramaları 500,000 jenerasyon için 4 zincirle ve ağaç örneklemesi her 200 jenerasyonda bir (ilk 100,000 ağaç "burn in" olarak çıkarılmıştır). Karakterizasyonu sağlanan tüm izolatların GenBank kayıtları sağlanmıştır.

3.10 *H. contortus* Popülasyonlarında Benzimidazol Dirençliliğinin Araştırılması

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

β tubulin izotip-1 gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacıyla *H. contortus*'un benzimidazol duyarlı ve dirençli alellerin kantitatif amplifikasyonu için ayrı ayrı TaqMan prob bazlı Real time PCR analizi yapılmıştır. Bu amaç için kullanılan primerler ve prob Tablo 3.3'de verilmiştir (166).

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

	Primer	**Dizilimi (5'---3')**	**TM* (^oC)**
Haemonchus contortus	BtubF	AAATAAGTCTCACCACCTGTAAACA	58.1
	BtubR	TTTCAAAGTGCGGAAGCAGATAT	57.1
	*BtubP S	Fam-TTCGTTGTCAATACAGAATGTTTCATCGGT-BHQ1	62.7
	*BtubP R	Fam- TTCGTTGTCAATACAGTATGTTTCATCGGT BHQ1	62.7

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

Real time PCR testinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla, Anabilim Dalında mevcut referens DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Real time PCR analizleri CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System'de (BioRad) gerçekleştirilmiştir. PCR master mix (SsoAdvanced Universal Probes Supermix, BioRad) üreticinin açıklamalarına göre toplam 20 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır ve kit prosedüründe belirtilen termal profil uygulanmıştır.

2X Master Mix 10 µl

Btub F (10 pmol) 1,0 µl

Btub R (10 pmol) 1,0 µl

Btub P (10 pmol) 1,0 µl

Genomik DNA (50 ngr) 1,0 µl

PCR Grade Deiyonize su 6 µl

Real time PCR analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler ve kantitatif değerler, amplifikasyon eğrileri ve Ct (dR) (Eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir. Allel sıklıklarının hesaplanmasında Germer ve ark. (167) tarafından tarif edilen aşağıdaki formülasyon kullanılmıştır. Duyarlı veya dirençli alleller yönünden Ct (dR) vermeyen örneklerin allel frekansı 0 alınırken diğer allel için 100 alınmıştır (168).

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

$\Delta Ct=(Allel_1Ct- Allel_2Ct)$

3.10.2 β tubulin izotip-1 Geninin Amplifikasyonu, Klonlama ve Sekans Analizleri

Real time PCR analizlerinde duyarlı allel sıklığı %100, dirençli alleller sıklığı >%50 belirlenen izolatlar β tubulin izotip-1 Geninin 813 bp kısmını amplifiye eden HcTub-s5 (GCCTGGAACGATGGACTCCGT) ve HcTub-as5 (GGCTAACTTGCGAAGAT CAGCAT) primerleri ile PCR analizine tabi tutulmuştur. Reaksiyon karışımı 25 µl final konsantrasyonda ve Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) içerisinde 10-20 ng template DNA içerecek şekilde final miks hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 95 ^{o}C'de 2 dk; 35 siklus, denaturation: 94 ^{o}C'de 30 s, annealing: 55 ^{o}C'de 30 s, extension: 72 ^{o}C'de 1 dk; final extension: 72 ^{o}C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (119). Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektoforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

Her iki allel yönünden allel sıklıklarına göre belirlenen izolatlara ait PCR ürünleri agaroz jel üzerinden High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak pürifiye edilmiştir. Pürifiye amplikonlar Madde 3.8.3'de belirtilen metodolojiye göre klonlanmış ve rekombinant plazmid eldesi yapılmıştır. İlgili gen bölgesi için elde edilmiş olan plazmid DNA'lar pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 10.1.2 (162) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin pairwise alignmentları yapılarak, vektör DNA'sı ile kıyaslanmış, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlemiş ve izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Duyarlı ve dirençli allellere özgü nükleotid dizileri karakterize edilmiş ve dirençliliğe özgü tek nükleotid mutasyonları belirlenerek sonuçların konfirmasyonu sağlanmıştır.

3.11 İstatistiksel Analiz

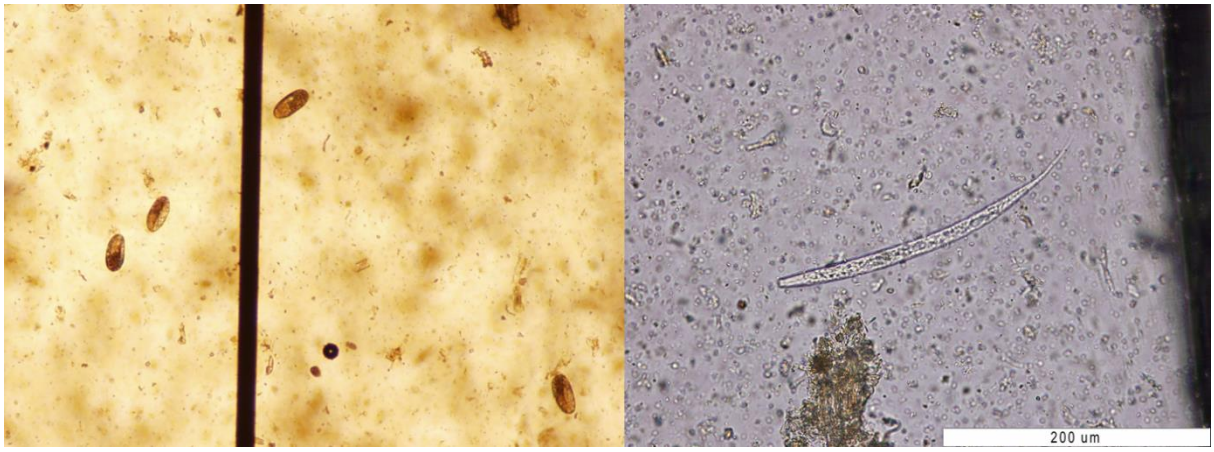
İstatistik analizler IBM SPSS Statistics 20 yazılımında gerçekleştirilmiştir. İncelenen sığırlarda *H. contortus* ve *O. ostertagia* moleküler prevalansı ile yaş, cinsiyet, ırk ve dışkı karakteri faktörlerinin ilişkisi, Pearson's Chi Square testi ile araştırılmıştır. Trichostrongylid

yumurtaları yönünden pozitif örneklerde EPG değerleri ile yaş, cinsiyet, ırk ve ve dışkı karakteri faktörlerinin ilişkisi Independent Samples T ve ANOVA testleriyle araştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Konvansiyonel Dışkı Muayenesi ve Larva Kültürü Sonuçları

Konvansiyonel dışkı muayenesi sonucunda, incelemesi yapılan toplam 920 sığırın 210'u (%22,8) Trichostrongylid yumurtaları (Şekil 4.1) yönünden pozitif bulunmuştur. Trichostrongylid yumurta pozitif örneklerin larva kültürü sonucu saptanan L3'ler Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Trichostrongylid yumurtaları ile pozitif belirlenen örneklerin, sığırların yaş, cinsiyet ve ırkı faktörlerine göre dağılımları Tablo 4.1-Tablo 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Dışkı örneklerinde Trichostrongylid yumurtaları ve kültür sonucu belirlenen larva

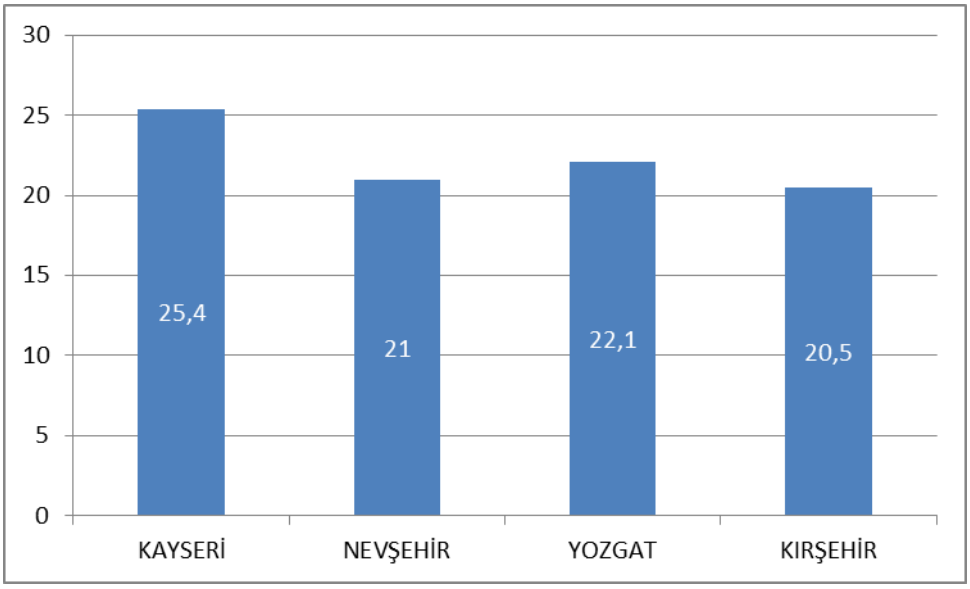
Tablo 4.1'de görüleceği araştırma yöresine göre Trichostrongylid yumurtaları ile pozitiflik en yüksek %25,4 ile Kayseri yöresinden örneklenen sığırlarda belirlenmiş bunu sırasıyla %22,1, %21,0 ve %20,5 ile Yozgat, Nevşehir ve Kırşehir yörelerinden örneklenen sığırlar izlemiştir. Örnekleme merkezlerine göre Trichostrongylid pozitifliğinin dağılım grafiği Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Araştırma illerinde Trichostrongylid yumurtaları ile pozitif belirlenen sığırların yaş ve cinsiyet özelliklerine göre dağılımları

İller	**Yaş**									**Cinsiyet**						**Toplam**		
	≤3 ay			4-12 ay			>12 ay			Erkek			Dişi					
	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%
Kayseri	50	16	32,0	132	51	38,6	172	19	11,0	135	26	19,3	219	59	26,9	354	90	25,4
Nevşehir	26	8	30,8	53	19	35,8	102	15	14,7	73	17	23,3	108	26	24,1	181	38	21,0
Yozgat	25	7	28,0	50	20	40,0	115	16	13,9	72	17	23,6	118	26	22,0	190	42	22,1
Kırşehir	22	6	27,3	58	19	32,8	115	14	12,2	85	15	17,6	110	24	21,8	195	40	20,5
Toplam	123	37	30,1	293	109	37,2	504	64	12,7	365	75	20,5	555	135	24,3	920	210	22,8

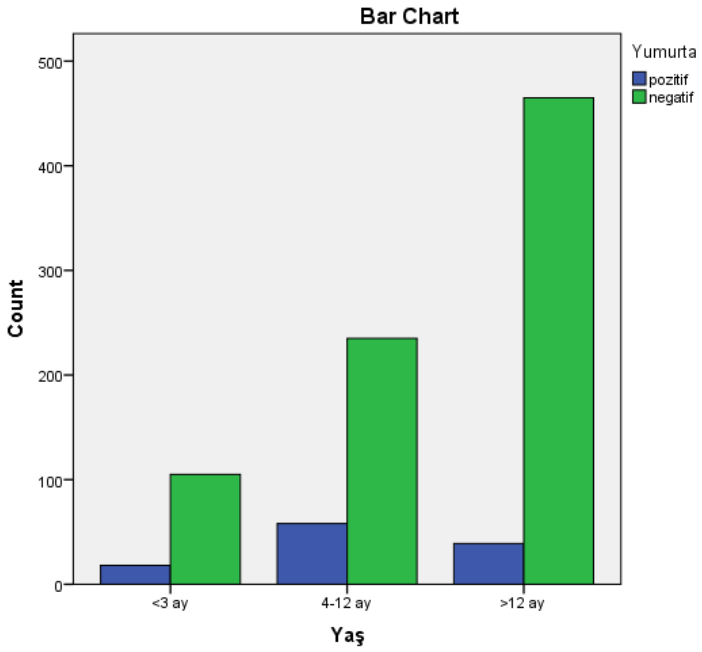
Tablo 4.2 Araştırma illerinde Trichostrongylid yumurtaları ile pozitif belirlenen sığırların ırk ve dışkı karakterlerine göre dağılımları

İller	**Irk**															**Dışkı Karakteri**									**Toplam**		
	Holstein			Simental			Montofon			Yerli			Melez			Normal			İshalli			Kanlı ishalli					
	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%
Kayseri	97	28	28,9	91	23	25,3	85	18	21,2	48	8	16,7	33	7	21,2	313	63	20,1	31	17	54,8	10	6	60,0	354	90	25,4
Nevşehir	48	12	25,0	45	9	20,0	44	9	20,5	33	7	21,2	11	4	36,4	164	30	18,3	13	9	69,2	4	3	75,0	181	38	21,0
Yozgat	56	13	23,2	46	11	23,9	39	9	23,1	30	6	20,0	19	5	26,3	176	30	17,0	11	10	90,9	3	2	66,7	190	42	22,1
Kırşehir	47	10	21,3	50	12	24,0	48	9	18,8	38	6	15,8	12	4	33,3	177	29	16,4	14	9	64,3	4	2	50,0	195	40	20,5
Toplam	248	63	25,4	232	55	23,7	216	45	20,8	149	27	18,1	75	20	26,7	830	152	18,3	69	45	65,2	21	13	61,9	920	210	22,8



Şekil 4.2 Örnekleme merkezlerine göre sığırlarda Trichostrongylid enfeksiyonlarının dağılımı

Yaş gruplarına göre sığırlarda Trichostronylid yumurta pozitifliği en yüksek %37,2 ile 4-12 ay grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla %30,1 ile ≤3 ay ve %12,7 ile >12 ay grupları izlemiştir (Tablo 4.1). Sığırların yaş gruplarına göre Trichostronylid enfeksiyonlarının dağılımı ayrıca Şekil 4.3'de verilmiştir. Yaş gruplarına göre Trichostronylid yumurta pozitifliğinin dağılımında 4-12 ay ve ≤3 ay yaş grupları ile >12 ay grubu arasındaki farklılık istatistiksel açıdan (Tablo 4.3) önemli ($p<0,001$) bulunurken 4-12 ay ve ≤3 ay yaş grupları arasındaki farklılık ise önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur.



Şekil 4.3 Sığırların yaş gruplarına göre Trichostrongylid enfeksiyonlarının dağılımı

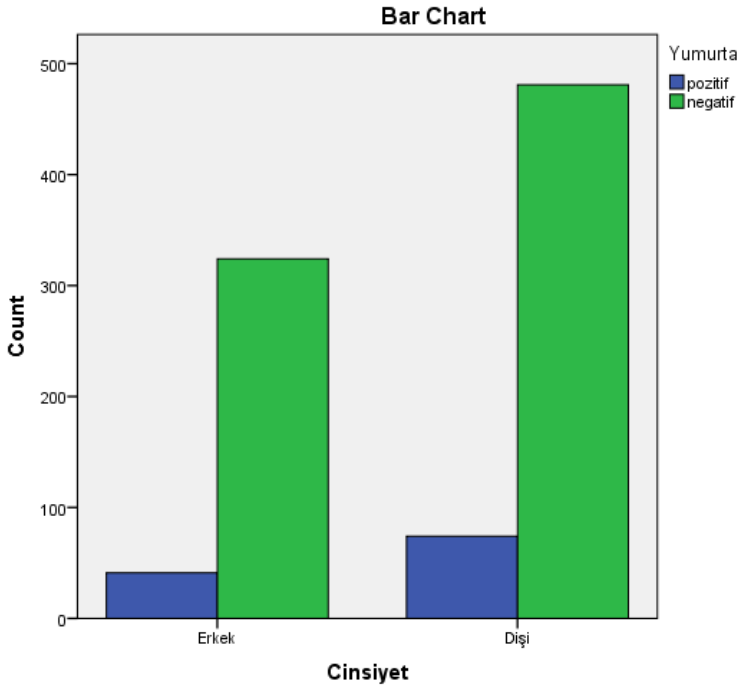
Tablo 4.3 Yaş gruplarına göre Trichostronylid pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	25,218[a]	2	,000
Likelihood Ratio	24,776	2	,000
Linear-by-Linear Association	13,798	1	,000
N of Valid Cases	920		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 15,38.

Sığırların cinsiyetine göre erkeklerde %20,5 dişilerde ise %24,3 oranında Trichostronylid yumurta pozitifliği belirlenmiştir (Tablo 4.1). Sığırların cinsiyetine göre Trichostronylid pozitifliğinin dağılımı ayrıca Şekil 4.4'de verilmiştir. Cinsiyete göre Trichostronylid pozitifliğinin dağılımındaki farklılık istatistiksel açıdan (Tablo 4.4) önemsiz bulunmuştur (p>0,05).



Şekil 4.4 Sığırların cinsiyetine göre Trichostronylid pozitifliğinin dağılımı

Tablo 4.4 Sığırların cinsiyetine göre Trichostronylid pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

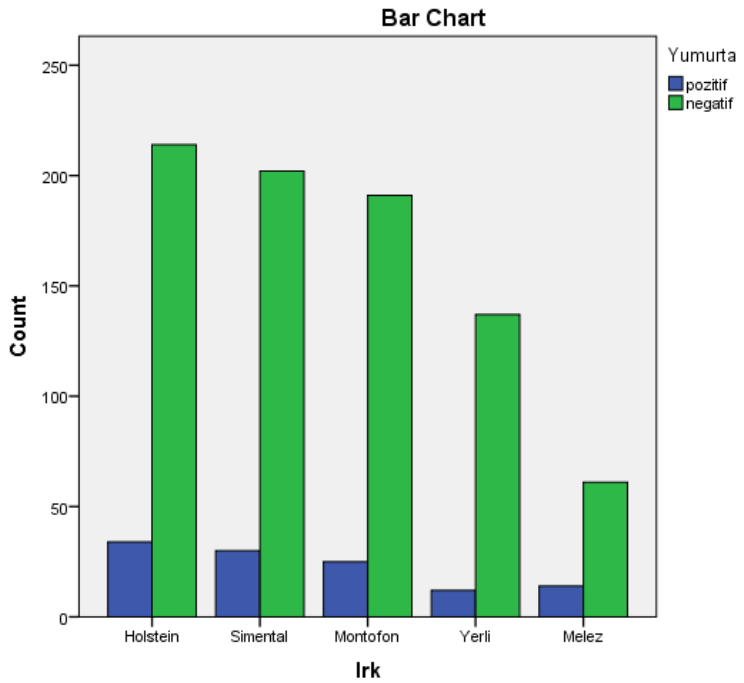
Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,888[a]	1	,346		
Continuity Correction[b]	,707	1	,401		
Likelihood Ratio	,898	1	,343		
Fisher's Exact Test				,361	,201
Linear-by-Linear Association	,887	1	,346		
N of Valid Cases	920				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 45,63.

b. Computed only for a 2x2 table

Holstein, Simental, Montofon, Yerli ve Melez ırklara ait örneklerde Trichostronylid yumurta pozitifliği sırasıyla %25,4, %23,7, %20,8, %18,1 ve %26,7 oranında saptanmıştır (Tablo 4.2). Sığırların ırkına göre Trichostronylid pozitifliğinin dağılımı ayrıca Şekil 4.5'de verilmiştir. Irka göre Trichostronylid pozitifliğinin dağılımında istatistiksel açıdan (Tablo 4.5) önemli bir farklılık bulunmamıştır (p>0,05).



Şekil 4.5 Sığırların ırkına göre Trichostronylid pozitifliğinin dağılımı

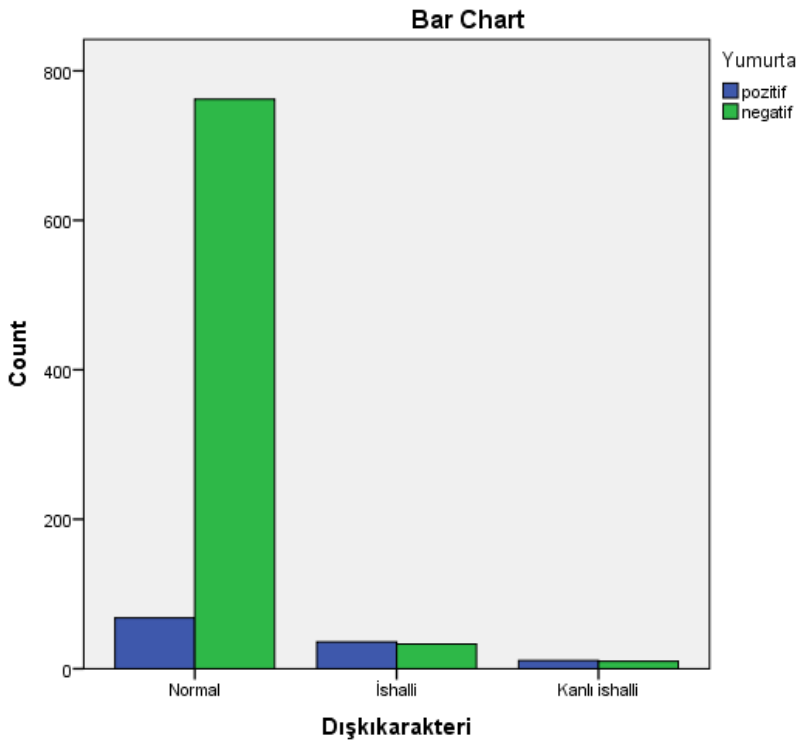
Tablo 4.5 Sığırların ırkına göre Trichostronylid pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5,841[a]	4	,211
Likelihood Ratio	5,878	4	,208
Linear-by-Linear Association	,119	1	,730
N of Valid Cases	920		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9,38.

Dışkı karakterine göre normal, ishalli ve kanlı ishalli dışkı örneklerinde Trichostronylid yumurta pozitifliği sırasıyla %18,3, %65,2 ve %61,9 oranında bulunmuştur (Tablo 4.2). Sığırların dışkı karakterine göre Trichostronylid yumurta pozitifliğinin dağılımı ayrıca Şekil 4.6'da verilmiştir. Dışkı karakterine göre Trichostronylid pozitifliğinin dağılımı ishalli ve kanlı ishalli dışkı gruplarında normal dışkı grubuna göre istatistiksel açıdan (Tablo 4.6) önemli bulunmuş (p<0,001), ishalli ve kanlı ishalli gruplar arasındaki farklılık ise önemsiz çıkmıştır (p>0,05).



Şekil 4.6 Sığırlarda dışkı karakterine göre Trichostronylid pozitifliğinin dağılımı

Tablo 4.6 Dışkı karakterine göre Trichostronylid pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	143,914[a]	2	,000
Likelihood Ratio	98,138	2	,000
Linear-by-Linear Association	127,371	1	,000
N of Valid Cases	920		

a. 1 cells (16,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,63.

4.2 Gram Dışkıdaki Yumurta Sayısı (EPG) ve İstatistiksel Analizi

Trichostronylid yumurtaları ile pozitif belirlenen 210 sığırda ortalama EPG değeri 460,1±34,0 (min:50,00, max:1000,00) belirlenmiştir. EPG değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılımları Tablo 4.7'de verilmiştir. Ortalama EPG değeri en yüksek <3 ay grubunda belirlenmiş, bunu 4-12 ay ve >12 ay yaş grupları izlemiştir (Şekil 4.7). >12 ay yaş grubu ile <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli (p<0,001) bulunurken <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları arasındaki farklılık önemsiz (p>0,05) belirlenmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.7 Trichostronylid yumurtaları ile pozitif belirlenen sığırlarda EPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımı

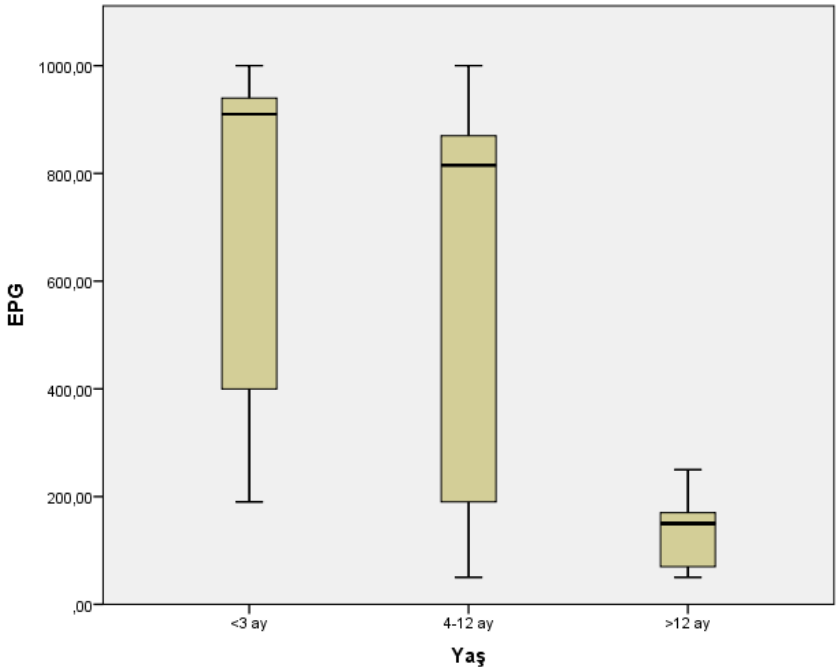
Descriptives

EPG

			Statistic	Bootstrap[a]			
				Bias	Std. Error	95% Confidence Interval	
						Lower	Upper
<3 ay	N		18	0	4	10	26
	Mean		744,4444	1,7006	68,4560	596,5863	868,0837
	Std. Deviation		295,96248	-12,49588	42,88650	178,65037	347,59171
	Std. Error		69,75903				
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	597,2658				
		Upper Bound	891,6231				
	Minimum		190,00				
	Maximum		1000,00				

4-12 ay	N		58	0	5	47	68
	Mean		595,6897	-,4392	43,6748	506,0655	680,8312
	Std. Deviation		343,09153	-2,82825	15,88939	305,75377	368,84259
	Std. Error		45,05012				
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	505,4783				
		Upper Bound	685,9010				
	Minimum		50,00				
	Maximum		1000,00				
>12 ay	N		39	0	5	29	49
	Mean		127,3077	,0051	8,4817	111,3235	145,0957
	Std. Deviation		54,73436	-,99094	4,14728	45,83306	62,14153
	Std. Error		8,76451				
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	109,5649				
		Upper Bound	145,0505				
	Minimum		50,00				
	Maximum		250,00				
Total	N		115	0	0	115	115
	Mean		460,1304	-,6146	33,1483	394,5674	527,9934
	Std. Deviation		364,58849	-1,54422	8,69132	344,79060	378,74489
	Std. Error		33,99805				
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	392,7806				
		Upper Bound	527,4803				
	Minimum		50,00				
	Maximum		1000,00				

[a.] Unless otherwise noted, bootstrap results are based on 1000 bootstrap samples



Şekil 4.7 EPG değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği

Tablo 4.8 Sığırlarda EPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımının istatistiksel analizi

Multiple Comparisons

Dependent Variable: EPG

	(I) Yaş	(J) Yaş	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
Tamhane	<3 ay	4-12 ay	148,75479	83,04117	,228	-60,2845	357,7941
		>12 ay	617,13675*	70,30746	,000	431,6590	802,6145
	4-12 ay	<3 ay	-148,75479	83,04117	,228	-357,7941	60,2845
		>12 ay	468,38196*	45,89478	,000	355,7209	581,0430
	>12 ay	<3 ay	-617,13675*	70,30746	,000	-802,6145	-431,6590
		4-12 ay	-468,38196*	45,89478	,000	-581,0430	-355,7209

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

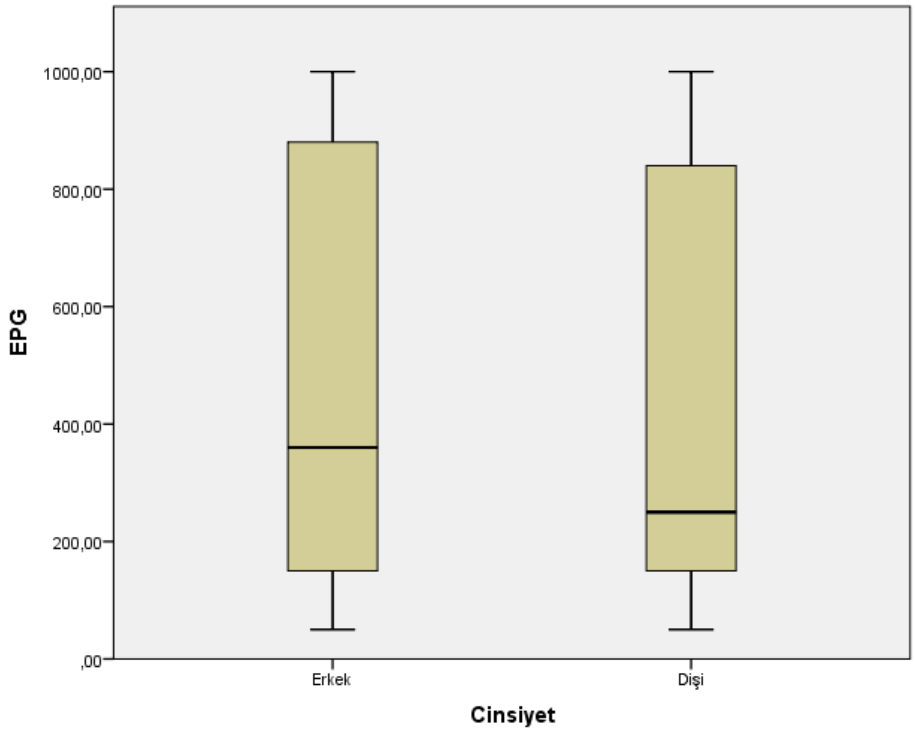
Sığırların cinsiyetine göre EPG değerleri dişilerde ortalam 440,9, erkeklerde ise 494,8 saptanmıştır (Tablo 4.9). EPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımında (Şekil 4.8) istatistiksel bir farklılık (p>0,05) görülmemiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.9 Trichostronylid yumurtaları ile pozitif belirlenen sığırlarda EPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımı

Group Statistics

	Cinsiyet		Statistic	Bootstrap[a] Bias	Std. Error	95% Confidence Interval Lower	Upper
EPG	Erkek	N	41				
		Mean	494,7561	3,5343	59,2073	380,5057	612,3644
		Std. Deviation	382,19588	-5,34919	13,13342	348,03240	400,20583
		Std. Error Mean	59,68897				
	Dişi	N	74				
		Mean	440,9459	,3913	42,2994	359,7310	524,1247
		Std. Deviation	355,66037	-2,61934	12,33139	326,20518	374,21344
		Std. Error Mean	41,34468				

a. Unless otherwise noted, bootstrap results are based on 1000 bootstrap samples



Şekil 4.8 OPG değerlerinin sığırların cinsiyetine göre dağılım grafiği

Tablo 4.10 Sığırlarda EPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımının istatistiksel analizi

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
EPG	Equal variances assumed	2,872	,093	,757	113	,451	53,81015	71,11477	-87,08104	194,70134
	Equal variances not assumed			,741	77,780	,461	53,81015	72,60961	-90,75091	198,37121

EPG değerlerinin sığırların ırkına göre dağılımları Tablo 4.11'de verilmiştir. Ortalama EPG değeri Holstein, Simental, Montofon, Yerli ve Melez ırkı sığırlarda sırasıyla 493,8, 441,7, 363,6, 358,8 ve 677,1 belirlenmiştir. EPG değerlerinin sığırların ırkına göre dağılımında (Şekil 4.9) istatistiksel bir farklılık (p>0,05) görülmemiştir (Tablo 4.12).

Tablo 4.11 Trichostronylid yumurtaları ile pozitif belirlenen sığırlarda EPG değerlerinin ırka göre dağılımı

Descriptives

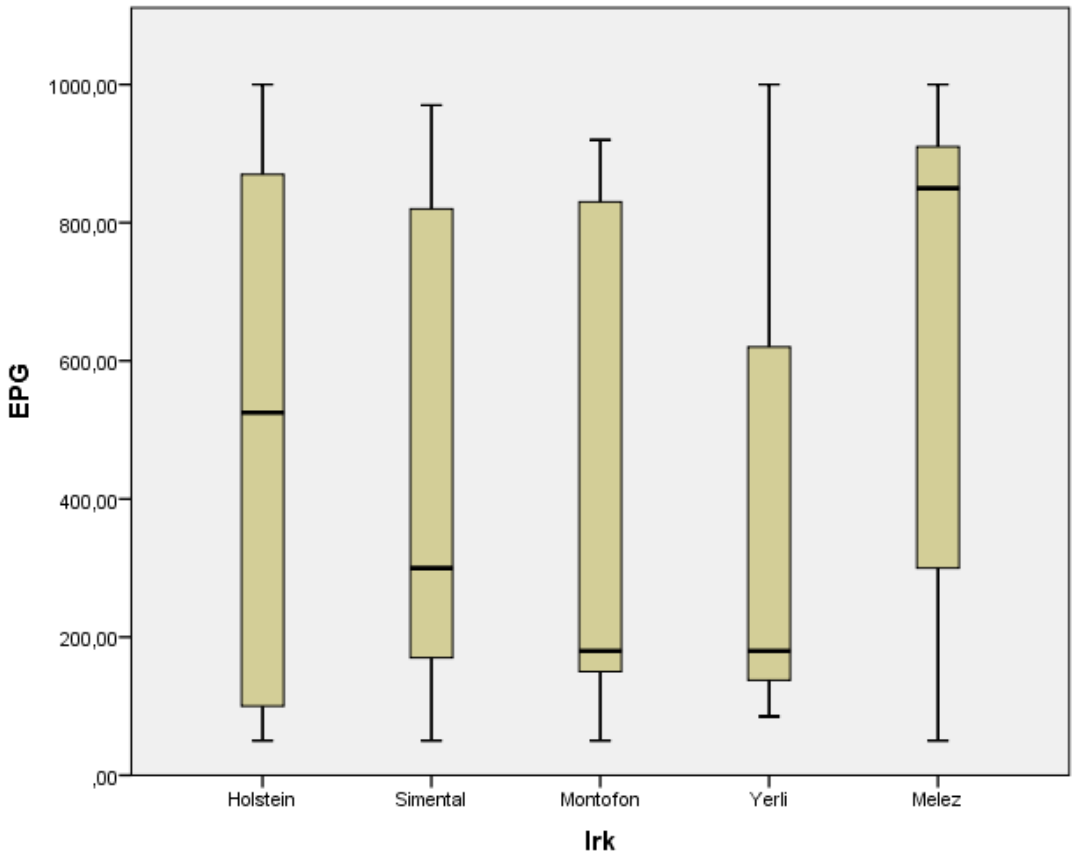
EPG

				Bootstrap[a]			
						95% Confidence Interval	
			Statistic	Bias	Std. Error	Lower	Upper
Holstein	N		34	0	5	24	43
	Mean		493,8235	2,1741	66,7183	370,2897	627,9297
	Std. Deviation		396,63749	-5,68726	13,23744	363,07833	413,54053
	Std. Error		68,02277				
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	355,4302				
		Upper Bound	632,2169				
	Minimum		50,00				

	Maximum		1000,00				
Simental	N		30	0	5	20	39
	Mean		441,6667	-,0866	61,3961	322,2324	565,8317
	Std. Deviation		333,19336	-6,30560	26,10628	269,86989	368,72965
	Std. Error		60,83251				
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	317,2502				
		Upper Bound	566,0831				
	Minimum		50,00				
	Maximum		970,00				
Montofon	N		25	0	4	17	34
	Mean		363,6000	2,0158	65,1100	239,5928	492,1949
	Std. Deviation		330,03005	-7,25281	32,10786	245,29623	371,25520
	Std. Error		66,00601				
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	227,3703				
		Upper Bound	499,8297				
	Minimum		50,00				
	Maximum		920,00				
Yerli	N		12	0	3	6	19
	Mean		358,7500	-4,2719	101,4496	165,1155	577,7546
	Std. Deviation		350,51991	-27,06131	78,79903	75,06474	420,23659
	Std. Error		101,18638				
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	136,0403				
		Upper Bound	581,4597				
	Minimum		85,00				
	Maximum		1000,00				
Melez	N		14	0	4	8	22
	Mean		677,1429	-2,2333	94,9949	465,5337	847,3660
	Std. Deviation		362,92463	-18,27471	62,77902	191,28577	434,73403
	Std. Error		96,99569				
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	467,5964				

		Upper Bound	886,6893				
	Minimum		50,00				
	Maximum		1000,00				
Total	N		115	0	0	115	115
	Mean		460,1304	,0162	34,4775	393,8113	528,5597
	Std. Deviation		364,58849	-1,89787	8,99158	343,16952	378,71141
	Std. Error		33,99805				
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	392,7806				
		Upper Bound	527,4803				
	Minimum		50,00				
	Maximum		1000,00				

a. Unless otherwise noted, bootstrap results are based on 1000 bootstrap samples



Şekil 4.9 EPG değerlerinin sığırların ırkına göre dağılım grafiği

Tablo 4.12 Sığırlarda EPG değerlerinin ırka göre dağılımının istatistiksel analizi

Multiple Comparisons

Dependent Variable: EPG

	(I) Irk	(J) Irk	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
Tamhane	Holstein	Simental	52,15686	91,25618	1,000	-212,7615	317,0752
		Montofon	130,22353	94,78339	,854	-145,9868	406,4338
		Yerli	135,07353	121,92531	,963	-244,5455	514,6926
		Melez	-183,31933	118,47050	,762	-545,0257	178,3871
	Simental	Holstein	-52,15686	91,25618	1,000	-317,0752	212,7615
		Montofon	78,06667	89,76295	,993	-184,4840	340,6173
		Yerli	82,91667	118,06472	,999	-289,5294	455,3627
		Melez	-235,47619	114,49348	,407	-588,8158	117,8635
	Montofon	Holstein	-130,22353	94,78339	,854	-406,4338	145,9868
		Simental	-78,06667	89,76295	,993	-340,6173	184,4840
		Yerli	4,85000	120,81174	1,000	-373,4750	383,1750
		Melez	-313,54286	117,32415	,123	-673,6703	46,5846
	Yerli	Holstein	-135,07353	121,92531	,963	-514,6926	244,5455
		Simental	-82,91667	118,06472	,999	-455,3627	289,5294
		Montofon	-4,85000	120,81174	1,000	-383,1750	373,4750
		Melez	-318,39286	140,16721	,282	-750,9211	114,1353
	Melez	Holstein	183,31933	118,47050	,762	-178,3871	545,0257
		Simental	235,47619	114,49348	,407	-117,8635	588,8158
		Montofon	313,54286	117,32415	,123	-46,5846	673,6703
		Yerli	318,39286	140,16721	,282	-114,1353	750,9211

EPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımları Tablo 4.13'de verilmiştir. Ortalama EPG değeri kanlı ishalli ve ishalli dışkılarda normal dışkı örneklerine göre yüksek belirlenmiş (Şekil 4.10) ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunmuştur (Tablo 4.14). Kanlı ishalli ve ishalli dışkı grupları arasındaki farklılık ise istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur.

Tablo 4.13 Trichostronylid yumurtaları ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımı

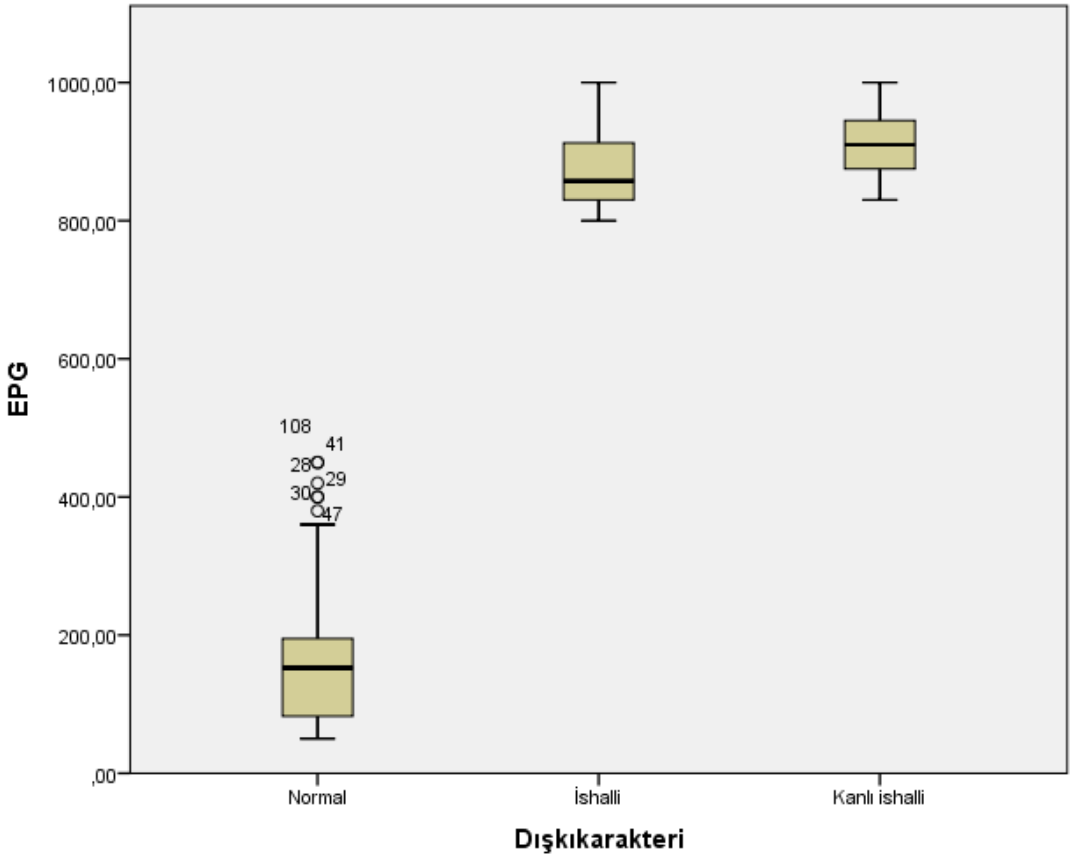
Descriptives

EPG

			Statistic	Bootstrap[a] Bias	Std. Error	95% Confidence Interval Lower	Upper
Normal	N		68	0	5	58	78
	Mean		167,4265	,4320	12,6488	142,4271	193,9409
	Std. Deviation		105,01774	-,88271	10,93607	82,99974	124,64611
	Std. Error		12,73527				
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	142,0068				
		Upper Bound	192,8462				
	Minimum		50,00				
	Maximum		450,00				
İshalli	N		36	0	5	26	46
	Mean		875,0000	-,0289	10,0773	855,6820	894,2298
	Std. Deviation		58,54180	-,97972	5,67121	45,28962	68,41081
	Std. Error		9,75697				
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	855,1923				
		Upper Bound	894,8077				
	Minimum		800,00				
	Maximum		1000,00				
Kanlı ishalli	N		11	0	3	5	18
	Mean		911,8182	,4446	15,7827	882,7427	943,3268
	Std. Deviation		53,06942	-3,56954	9,63711	28,39822	68,23972
	Std. Error		16,00103				
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	876,1657				
		Upper Bound	947,4707				
	Minimum		830,00				
	Maximum		1000,00				
Total	N		115	0	0	115	115

	Mean	460,1304	1,7686	33,6988	395,0468	525,5151
	Std. Deviation	364,58849	-1,53003	8,81455	341,89305	378,66957
	Std. Error	33,99805				
	95% Confidence Interval for Mean — Lower Bound	392,7806				
	95% Confidence Interval for Mean — Upper Bound	527,4803				
	Minimum	50,00				
	Maximum	1000,00				

a. Unless otherwise noted, bootstrap results are based on 1000 bootstrap samples



Şekil 4.10 EPG değerlerinin sığırların dışkı karakterlerine göre dağılım grafiği

Tablo 4.14 Sığırlarda EPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımının istatistiksel analizi

Multiple Comparisons

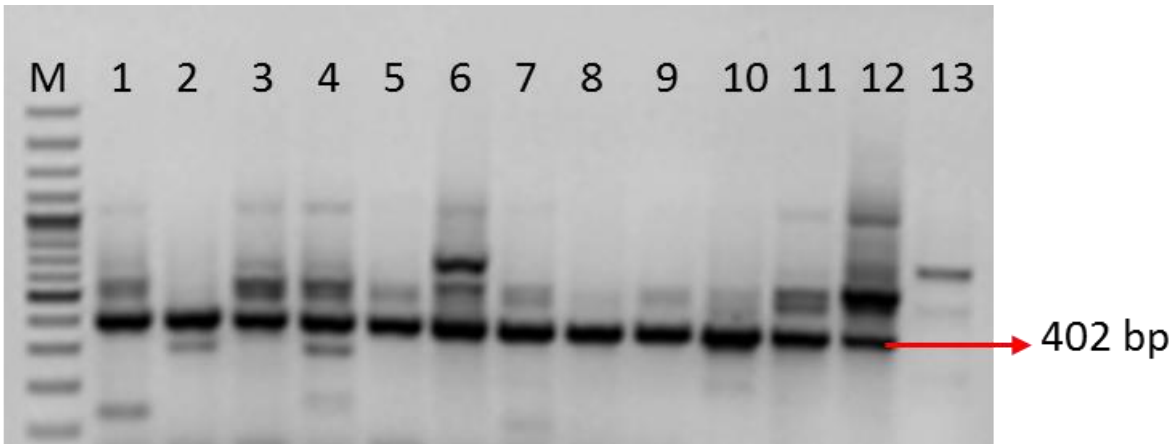
Dependent Variable: EPG

	(I) Dışkıkarakteri	(J) Dışkıkarakteri	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
Tamhane	Normal	İshalli	-707,57353*	16,04324	,000	-746,5218	-668,6253
		Kanlı ishalli	-744,39171*	20,45043	,000	-796,6880	-692,0954
	İshalli	Normal	707,57353*	16,04324	,000	668,6253	746,5218
		Kanlı ishalli	-36,81818	18,74117	,183	-86,0993	12,4629
	Kanlı ishalli	Normal	744,39171*	20,45043	,000	692,0954	796,6880
		İshalli	36,81818	18,74117	,183	-12,4629	86,0993

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

4.3 Mt-COI Geninin Amplifikasyonu

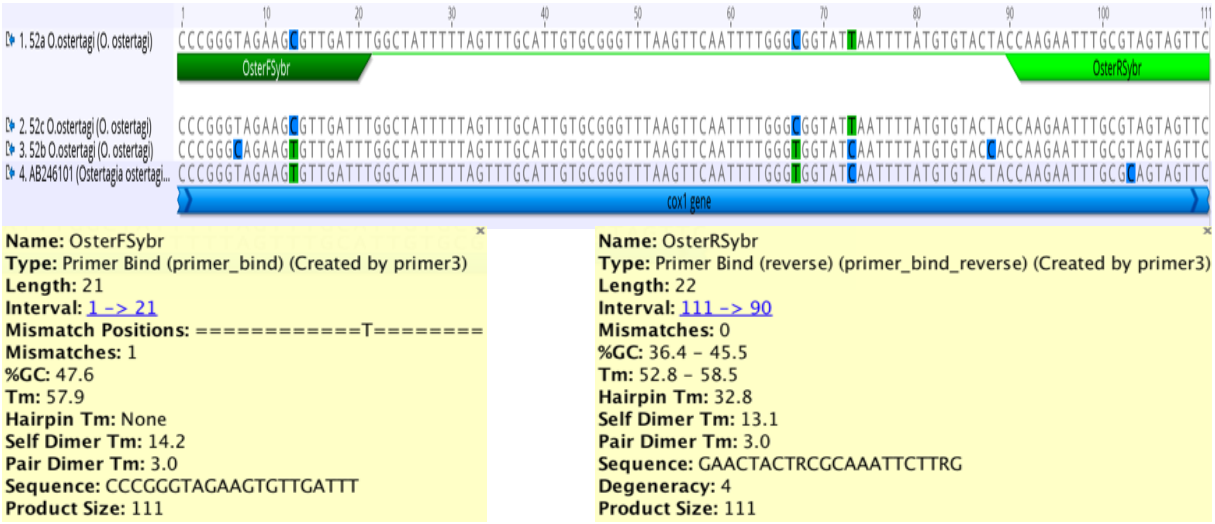
Trichostrongylid yumurta ve larva (L3) süspansiyonlarından izole edilen genomik DNA'ların mt-COI genini parsiyel olarak amplifiye eden genel primerlerle agaroz jel üzerinde hedef büyüklükte (402 bp) PCR ürünleri belirlenmiş (Şekil 4.11) ve genomik DNA izolasyonları konfirme edilmiştir.



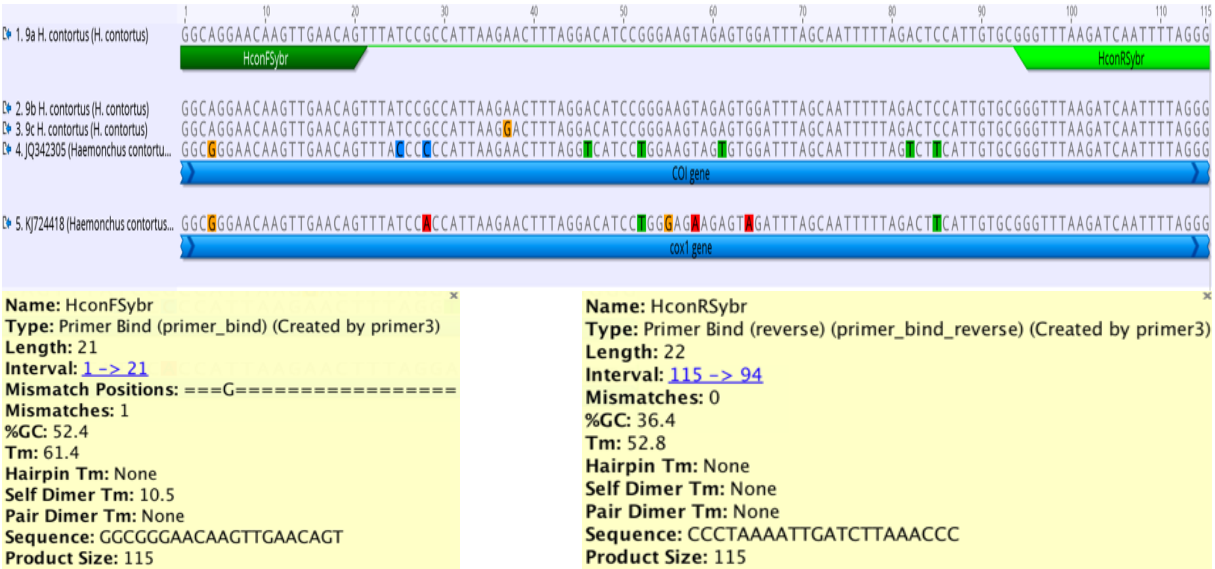
Şekil 4.11 İzolatların mt-COI gen bölgesi spesifik primerlerle nested PCR sonucu amplifikasyonu

4.4 Sybergreen Real Time PCR Sensitivite ve Spesifite Analiz Sonuçları

Real Time PCR'da kantitatif identifikasyonları için mt-COI gen bölgesinden dizayn edilen primer dizilerinin karakterleri ve bağlanma spesifiteleri *O. ostertagi* ve *H. contortus* için sırasıyla Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de verilmiştir. Şekillerde görüleceği üzere her iki tür için de primerlerin tür spesifik olarak hedef DNA bölgesine bağlandığı belirlenmiştir.

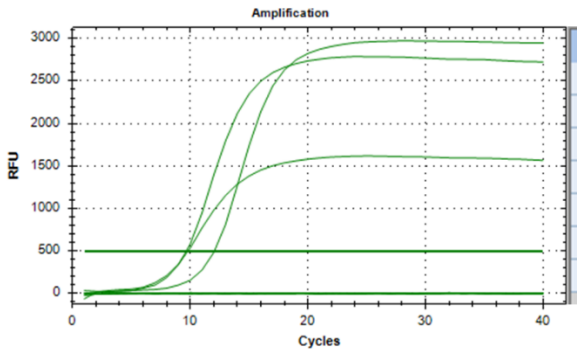


Şekil 4.12 *O. ostertagi* mt-COI gen bölgesinden dizayn edilen primer çiftinin bağlanma spesifiteleri ve özellikleri



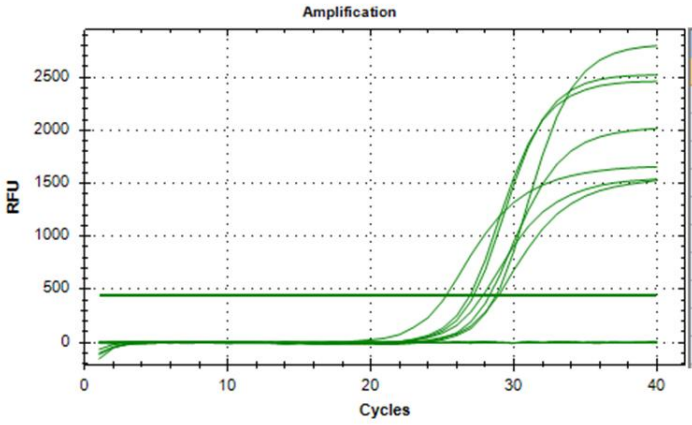
Şekil 4.13 *H. contortus* mt-COI gen bölgesinden dizayn edilen primer çiftinin bağlanma spesifiteleri ve özellikleri

Dizayn edilen tüm final Real Time PCR markerlarının genetik analizlerle paralel şekilde spesifik olarak hedef türlerini amplifiye ettiği belirlenmiş, hedef dışı sığır Trichostrongylid türlerine ait mt-COI genomik DNA ve/veya plazmidleri ile reaksiyon vermedikleri saptanmıştır (Şekil 4.14-Şekil 15). Melting curve analizlerinde (Şekil 4.16-Şekil 17) ayrıca *O. ostertagi* ve *H. contortus* için erime sıcaklıkları spesifik olarak sırasıyla 80,0°C ve 75,0°C belirlenmiştir.



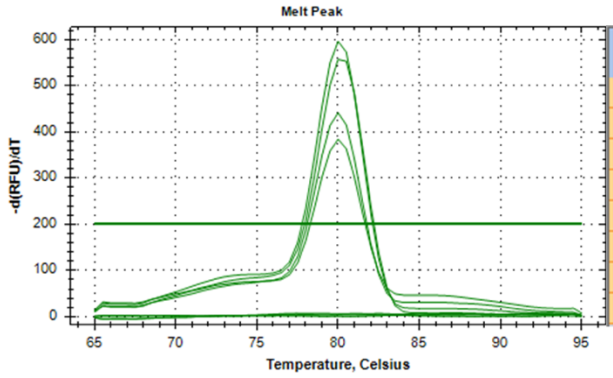
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
E03	SYBR		Unkn	Ooest4	12,02
E02	SYBR		Unkn	Ooest3	9,75
D08	SYBR		Unkn	Ooest1	9,61
E06	SYBR		Unkn	Cooperia	N/A
E05	SYBR		Unkn	Haemoncus	N/A
E07	SYBR		Unkn	Nematodirus	N/A
E08	SYBR		Unkn	No DNA	N/A

Şekil 4.14 *O. ostertagi* izolatlarına ait hedef mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerlerle sybergreen Real Time PCR'da belirlenen amplifikasyon eğrileri.



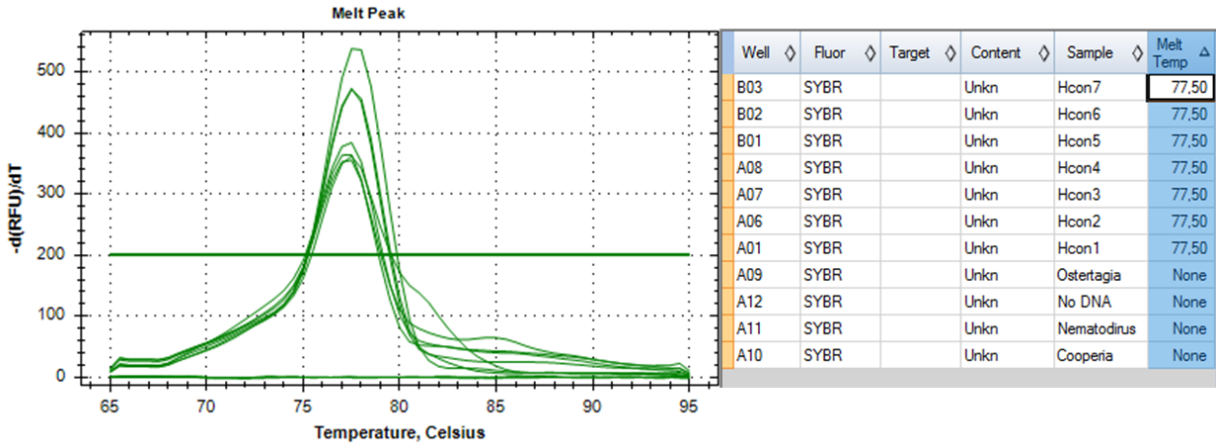
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
B02	SYBR		Unkn	Hcon6	28,95
A06	SYBR		Unkn	Hcon2	28,76
B01	SYBR		Unkn	Hcon5	28,31
A01	SYBR		Unkn	Hcon1	27,86
A07	SYBR		Unkn	Hcon3	27,20
A08	SYBR		Unkn	Hcon4	26,96
B03	SYBR		Unkn	Hcon7	25,29
A10	SYBR		Unkn	Cooperia	N/A
A11	SYBR		Unkn	Nematodirus	N/A
A12	SYBR		Unkn	No DNA	N/A
A09	SYBR		Unkn	Ostertagia	N/A

Şekil 4.15 *H. contortus* izolatlarına ait hedef mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerlerle sybergreen Real Time PCR'da belirlenen amplifikasyon eğrileri.



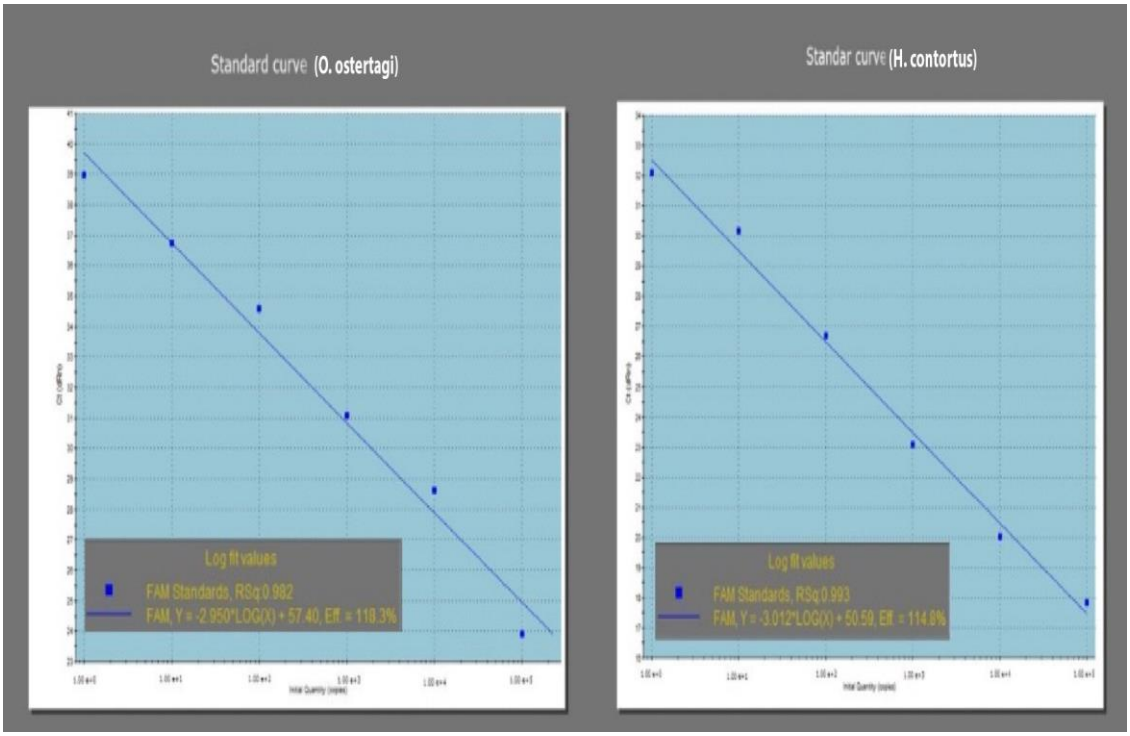
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Melt Temp
E03	SYBR		Unkn	Ooest4	80,00
E02	SYBR		Unkn	Ooest3	80,00
E01	SYBR		Unkn	Ooest2	80,00
D08	SYBR		Unkn	Ooest1	80,00
E08	SYBR		Unkn	No DNA	None
E07	SYBR		Unkn	Nematodirus	None
E05	SYBR		Unkn	Haemoncus	None
E06	SYBR		Unkn	Cooperia	None

Şekil 4.16 *O. ostertagi* izolatlarına ait hedef mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerlerle sybergreen Real Time PCR'da melting curve analizleri ile belirlenen spesifik erime noktaları



Şekil 4.17 *H. contortus* izolatlarına ait hedef mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerlerle sybergreen Real Time PCR'da melting curve analizleri ile belirlenen spesifik erime noktaları

O. ostertagi ve *H. contortus* türleri için linearize plazmidler kullanılarak oluşturulan standart eğri analiz sonuçlarına göre sybergreen real time PCR etkinlik oranları yüksek belirlenmiştir (Şekil 4.18). Elde edilen verilerle her bir replikasyonda tüm türler için 10 hedef kopyanın saptanabileceği belirlenmiştir. DNA kopya sayısındaki bu miktar sekiz haploid genom içeren tek bir yumurtaya karşılık gelmektedir (Vrba et al., 2010).



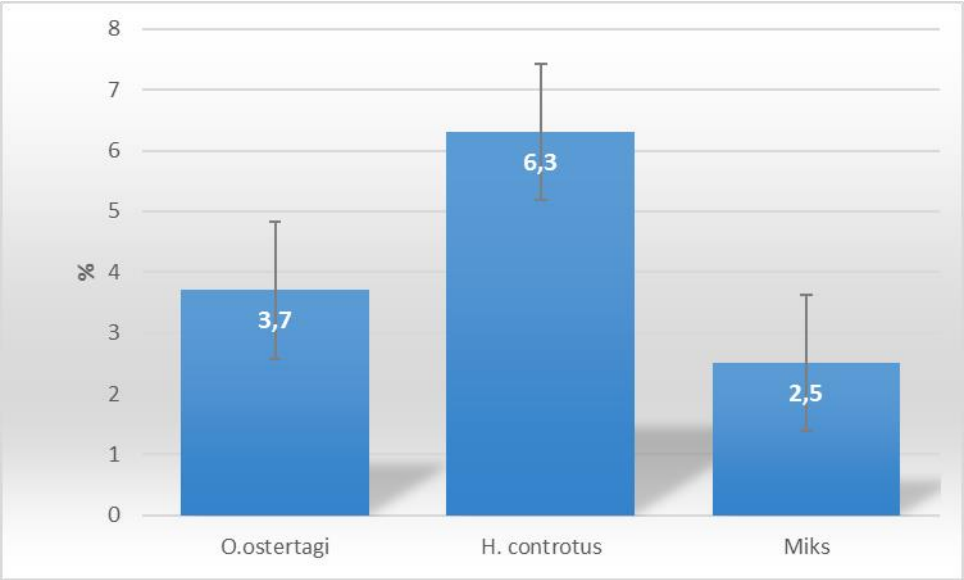
Şekil 4.18 *O. ostertagi* ve *H. contortus* için linearize plazmidler kullanılarak oluşturulan standart eğriler ve etkinlik oranları.

4.5 Sybergreen Real Time PCR ile Trichostrongylid Yumurta Pozitif İzolatlarda *O. ostertagi* ve *H. contortus* Pozitiflikleri, Moleküler Prevalans ve İstatistiksel Analiz Sonuçları

Trichostrongylid yumurtaları ile pozitif saptanan örneklere ait genomik DNA izolatlarının *O. ostertagi* ve *H. contortus* türleri yönünden sybergreen real time PCR ile analiz sonuçları, Tablo 4.15'de verilmiştir. Tablo 4.15'de görüldüğü üzere Trichostrongylid yumurta pozitif 210 örneğin 34'ünde *O. ostertagi,* 58'inde *H. contortus* ve 23'ünde her iki türle miks enfeksiyon pozitifliği belirlenmiş ve incelenen toplam 920 sığır örneği bazında iki tür için moleküler prevalans oranları sırasıyla %6,2 ve %8,8 (Şekil 4.17) olarak saptanmıştır.

Tablo 4.15 Trichostrongylid yumurtaları ile pozitif saptanan örneklere ait genomik DNA izolatlarının *O. ostertagi* ve *H. contortus* türleri yönünden sybergreen Real Time PCR sonuçları

İncelenen Örnek Sayısı	**Trichostrongylid yumurta pozitif örnek sayısı**	**Real Time PCR Tür İdentifikasyonu**	**Prevalans**	
			Sayı	%
920	210	*O. ostertagia*	34	3,7
		H. contortus	58	6,3
		Miks	23	2,5



Şekil 4.19 Trichostrongylid yumurtaları ile pozitif saptanan örneklerde belirlenen *O. ostertagi* ve *H. contortus* türlerinin incelenen sığır sayısına göre dağılım grafiği

Araştırma merkezlerine göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansı Tablo 4.16'de verilmiştir. Her dört araştırma yöresi için de *H. contortus* prevalansı *O. ostertagi* prevalansına göre yüksek belirlenmiştir.

Tablo 4.16 Araştırma merkezlerine göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansı

Araştırma Merkezi	**İncelenen Hayvan Sayısı**	**Tür**	**Prevalans**	
			Sayı	%
Kayseri	354	*O. ostertagi*	23	6,5
		H. contortus	33	9,3
Nevşehir	181	*O. ostertagi*	10	5,5
		H. contortus	15	8,3
Yozgat	190	*O. ostertagi*	12	6,3
		H. contortus	14	7,4
Kırşehir	195	*O. ostertagi*	12	9,2
		H. contortus	19	9,7

İncelenen sığırların yaş gruplarına göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansları Tablo 4.17'de istatistik analiz sonuçları ise sırasıyla Tablo 4.18 ve Tablo 4.19'de verilmiştir. Hem *O. ostertagi* hem de *H. contortus* prevalansı en yüksek 4-12 ay yaş grubu sığırlarda belirlenmiş bunu sırasıyla <3 ay ve >12 ay yaş grubu sığırlar izlemiştir. ($p<0,001$). Her iki tür için de 4-12 ay ve <3 ay ile >12 ay yaş grubu sığırlar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunurken 4-12 ay ve <3 ay yaş grupları arasındaki farklılık önemsiz belirlenmiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.17 Yaş gruplarına göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansı

Yaş Grubu	**İncelenen Hayvan Sayısı**	**Tür**	**Prevalans**	
			Sayı	%
<3 ay	123	*O. ostertagi*	10	8,1
		H. contortus	15	12,2
4-12 ay	293	*O. ostertagi*	36	12,3
		H. contortus	49	16,7
>12 ay	504	*O. ostertagi*	11	2,2
		H. contortus	17	3,4

Tablo 4.18 Yaş gruplarına göre *O. ostertagia* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	33,463[a]	2	,000
Likelihood Ratio	33,864	2	,000
Linear-by-Linear Association	18,718	1	,000
N of Valid Cases	920		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7,62.

Tablo 4.19 Yaş gruplarına göre *H. contortus* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	43,164[a]	2	,000
Likelihood Ratio	43,859	2	,000
Linear-by-Linear Association	26,383	1	,000
N of Valid Cases	920		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 10,83.

İncelenen sığırların cinsiyetine göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansları Tablo 4.20'de istatistik analiz sonuçları ise sırasıyla Tablo 4.21 ve Tablo 4.22'de verilmiştir. Hem *O. ostertagi* hem de *H. contortus* prevalansı erkeklerde yüksek bulunmasına karşın farklılıklar istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur (p>0,05).

Tablo 4.20 Cinsiyete göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansı

Yaş Grubu	**İncelenen Hayvan Sayısı**	**Tür**	**Prevalans**	
			Sayı	%
Erkek	365	*O. ostertagi*	26	7,1
		H. contortus	36	9,9
Dişi	555	*O. ostertagi*	31	5,6
		H. contortus	45	8,1

Tablo 4.21 Cinsiyetine göre *O. ostertagia* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,896[a]	1	,344		
Continuity Correction[b]	,651	1	,420		
Likelihood Ratio	,884	1	,347		
Fisher's Exact Test				,402	,209
Linear-by-Linear Association	,895	1	,344		
N of Valid Cases	920				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 22,61.

b. Computed only for a 2x2 table

Tablo 4.22 Cinsiyetine göre *H. contortus* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,845[a]	1	,358		
Continuity Correction[b]	,640	1	,424		
Likelihood Ratio	,835	1	,361		
Fisher's Exact Test				,405	,211
Linear-by-Linear Association	,844	1	,358		
N of Valid Cases	920				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 32,14.

b. Computed only for a 2x2 table

İncelenen sığırların ırkına göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansları Tablo 4.23'de istatistik analiz sonuçları ise sırasıyla Tablo 4.24 ve Tablo 4.25'de verilmiştir. Irk grupları arasındaki istatistiksel farklılık her iki tür için de önemsiz bulunmuştur (p>0,05).

Tablo 4.23 Irka göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansı

Yaş Grubu	**İncelenen Hayvan Sayısı**	**Tür**	**Prevalans**	
			Sayı	%
Holstein	248	*O. ostertagi*	20	8,1
		H. contortus	25	10,1
Simental	232	*O. ostertagi*	13	5,6
		H. contortus	18	7,8
Montofon	216	*O. ostertagi*	12	5,6
		H. contortus	20	9,3
Yerli	149	*O. ostertagi*	6	4,0
		H. contortus	8	5,4
Melez	75	*O. ostertagi*	6	8,0
		H. contortus	10	10,3

Tablo 4.24 Irka göre *O. ostertagia* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	3,409[a]	4	,492
Likelihood Ratio	3,424	4	,490
Linear-by-Linear Association	,827	1	,363
N of Valid Cases	920		

a. 1 cells (10,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,65.

Tablo 4.25 Irka göre *H. contortus* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	4,981[a]	4	,289
Likelihood Ratio	5,058	4	,281
Linear-by-Linear Association	,042	1	,838
N of Valid Cases	920		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,60.

İncelenen sığırların dışkı karakterlerine göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansları Tablo 4.26'da istatistik analiz sonuçları ise sırasıyla Tablo 4.27 ve Tablo 4.28'de verilmiştir. *O. ostertagi* prevalansı ishalli grupta, kanlı ishalli ve normal dışkı gruplarına göre yüksek

belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0,05). Kanlı ishalli ve normal dışkı grupları arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur (p>0,05). *H. contortus* prevalansı ise kanlı ishalli ve ishalli dışkı gruplarında normal dışkı karakteri grubuna oranla daha yüksek belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0,001). Kanlı ishalli ve ishalli dışkı grupları arasındaki farklılık ise önemsiz saptanmıştır (p>0,05).

Tablo 4.26 Dışkı karakterine göre *O. ostertagi* ve *H. contortus* prevalansı

Dışkı Karakteri	**İncelenen Hayvan Sayısı**	**Tür**	**Prevalans**	
			Sayı	%
Kanlı ishalli	21	*O. ostertagi*	1	4,8
		H. contortus	7	33,3
İshalli	69	*O. ostertagi*	12	16,7
		H. contortus	32	44,4
Normal	830	*O. ostertagi*	44	5,3
		H. contortus	42	5,1

Tablo 4.27 Dışkı karakterine göre *O. ostertagia* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	14,747[a]	2	,001
Likelihood Ratio	10,768	2	,005
Linear-by-Linear Association	5,830	1	,016
N of Valid Cases	920		

a. 2 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,30.

Tablo 4.28 Dışkı karakterine göre *H. contortus* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

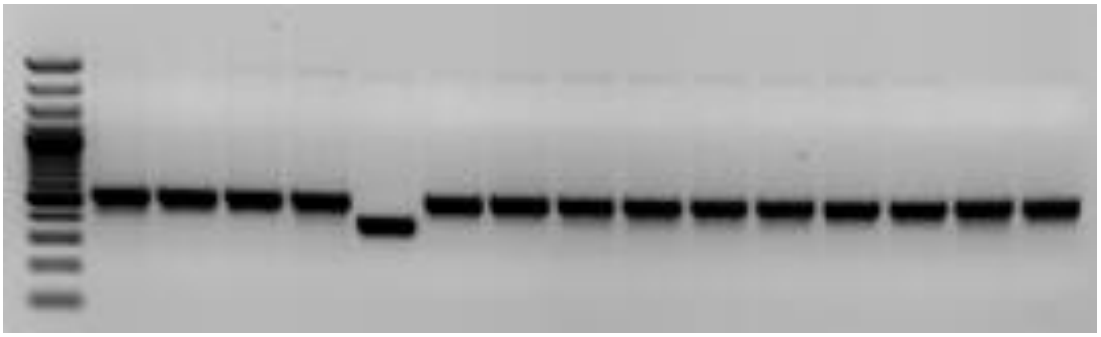
Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	143,938[a]	2	,000
Likelihood Ratio	90,480	2	,000
Linear-by-Linear Association	113,414	1	,000
N of Valid Cases	920		

a. 1 cells (16,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,85.

4.6 Mt-COI Gen Bölgesinin Sekans Analizi Sonuçları

Sybergreen Real Time PCR analizleri temelinde her iki tür için eşik değer siklusu uygun (Ct (dR)<22) belirlenen örneklere ait genomik DNA izolatları mt-COI gen bölgesi sekanslarının kayıpsız elde ve özgün olarak elde edilmesi için önce gen spesifik primerlerle amplifikasyona tabii tutulmuş, sonrasında da elde edilen PCR ürünleri jel pürifiye edilerek uygun plazmid vektörlere klonlanmıştır. Klonlama basamaklarında miks enfeksiyonlar göz önüne alınarak LB besi yerinde üreyen koloniler tekrar çoğaltıldıktan sonra spesifik sybergreen Real Time PCR analizleri ile her iki tür için ilgili gen bölgesini barındıran koloniler belirlenmiştir. Daha sonra bu koloniler sıvı besi yerine aktarılarak rekombinant plazmid eldesi yapılmıştır. Elde edilen plazmidlerde hedef insert genlerin konfirmasyonu vektör spesifik primerlerle PCR analizleri (Şekil 4.20) sonucu yapılmıştır.



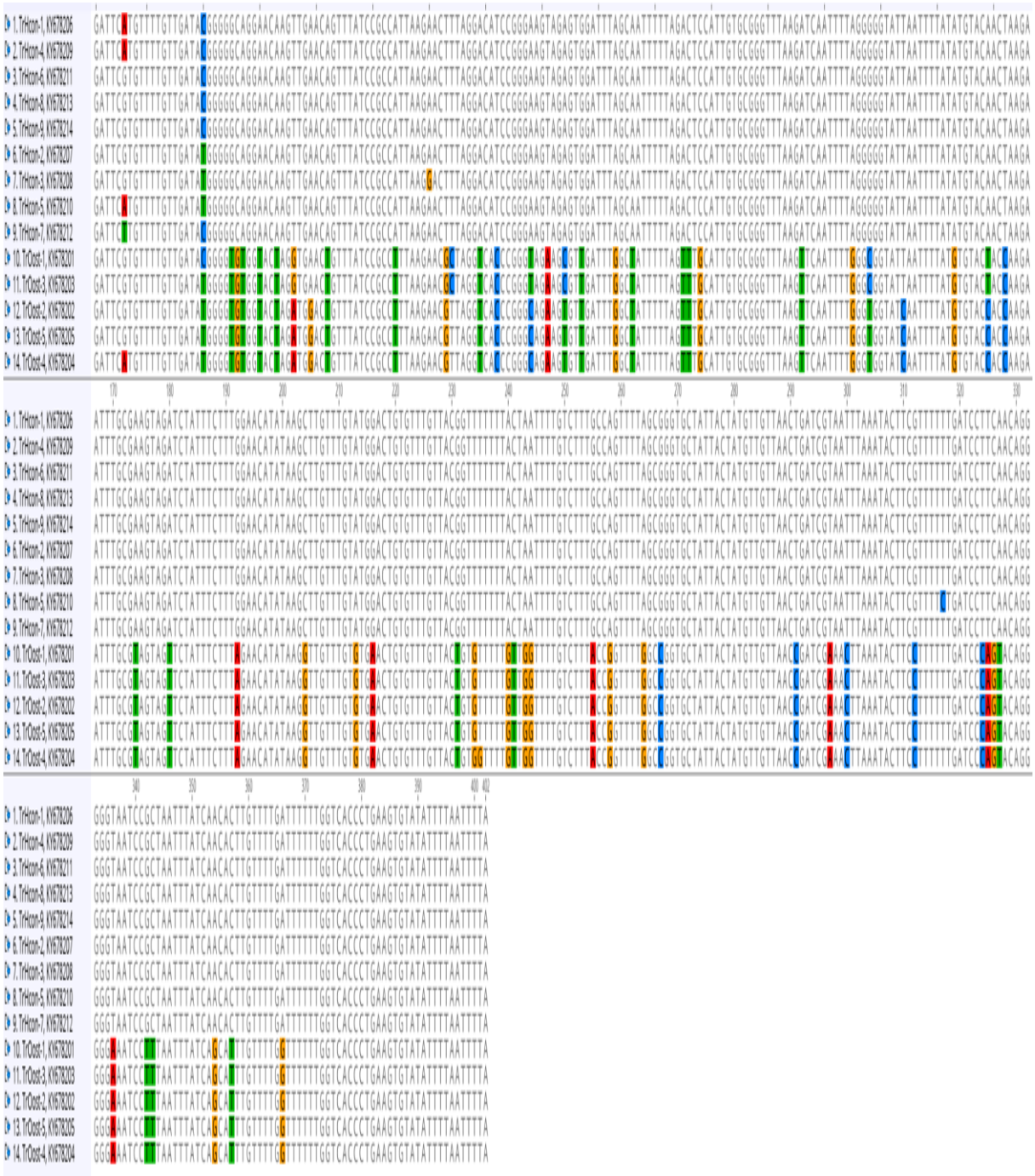
Şekil 4.20 Bazı plazmidlerde hedef insert genlerin vektör spesifik primerlerle PCR analizleri sonucu belirlenen amplikonlar

Elde edilen toplam 14 plazmid DNA izolatının vektör spesifik pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekans analizi sonucu Blastn algoritması kullanılarak tür ve/veya haplotip bazında konfirmasyonları sağlanmıştır. Mt-COI gen bölgesine göre karakterize edilen izolatlar, ait oldukları tür, izolasyon bölgeleri ve GenBank aksesyon numaraları ile birlikte Tablo 4.29'da verilmiştir.

Tablo 4.29 Klonlama ve plazmid pürifikasyonuna tabii tutulan genomik DNA izolatları

Genomik DNA İzolatı	Tür	İzolasyon bölgesi	GenBank Aks.
TrOost-1	*O. ostertagi*	Kayseri	KY678201
TrOost-2	*O. ostertagi*	Kayseri	KY678202
TrOost-3	*O. ostertagi*	Nevşehir	KY678203
TrOost-4	*O. ostertagi*	Yozgat	KY678204
TrOost-5	*O. ostertagi*	Kırşehir	KY678205
TrHcon-1	*H. contrortus*	Kayseri	KY678206
TrHcon-2	*H. contrortus*	Kayseri	KY678207
TrHcon-3	*H. contrortus*	Kayseri	KY678208
TrHcon-4	*H. contrortus*	Nevşehir	KY678209
TrHcon-5	*H. contrortus*	Nevşehir	KY678210
TrHcon-6	*H. contrortus*	Kırşehir	KY678211
TrHcon-7	*H. contrortus*	Kırşehir	KY678212
TrHcon-8	*H. contrortus*	Yozgat	KY678213
TrHcon-9	*H. contrortus*	Yozgat	KY678214

Çalışmada *O. ostertagia* ve *H. contortus* türlerine ait mt-COI gen bölgesinin 402 bp kısmını içeren toplam 14 sekans başarıyla elde edilmiştir. *O. ostertagi* izolatlarına ait sekanslar arasında 391 (%97,3)identik bölge belirlenirken 4 farklı haplotipi ortaya koyan 11 polimorfik bölge saptanmıştır. *H. contortus* izolatlarına ait sekanslar arasında ise 398 (%99,0) identik bölge saptanmış, 6 farklı haplotipi ortaya koyan 4 polimorfik bölge görülmüştür. Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılan *O. ostertagia ve H. contortus* izolatlarının nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları Şekil 4.21'de gösterilmiştir. Şekil 4.21'de görüldüğü izolatlar arasında farklı haplotipleri ortaya koyan interspesifik ve intraspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Sekanslanan *O. ostertagi* izolatları arasında ortalama pairwise identiklik oranı %98,5 belirlenmiş bu oran *H. contortus* izolatları için ise %99,6 saptanmıştır. İkili hizlama analiz sonucu belirlenen farklılıklar ayrıca Tablo 4.30'da verilmiştir.



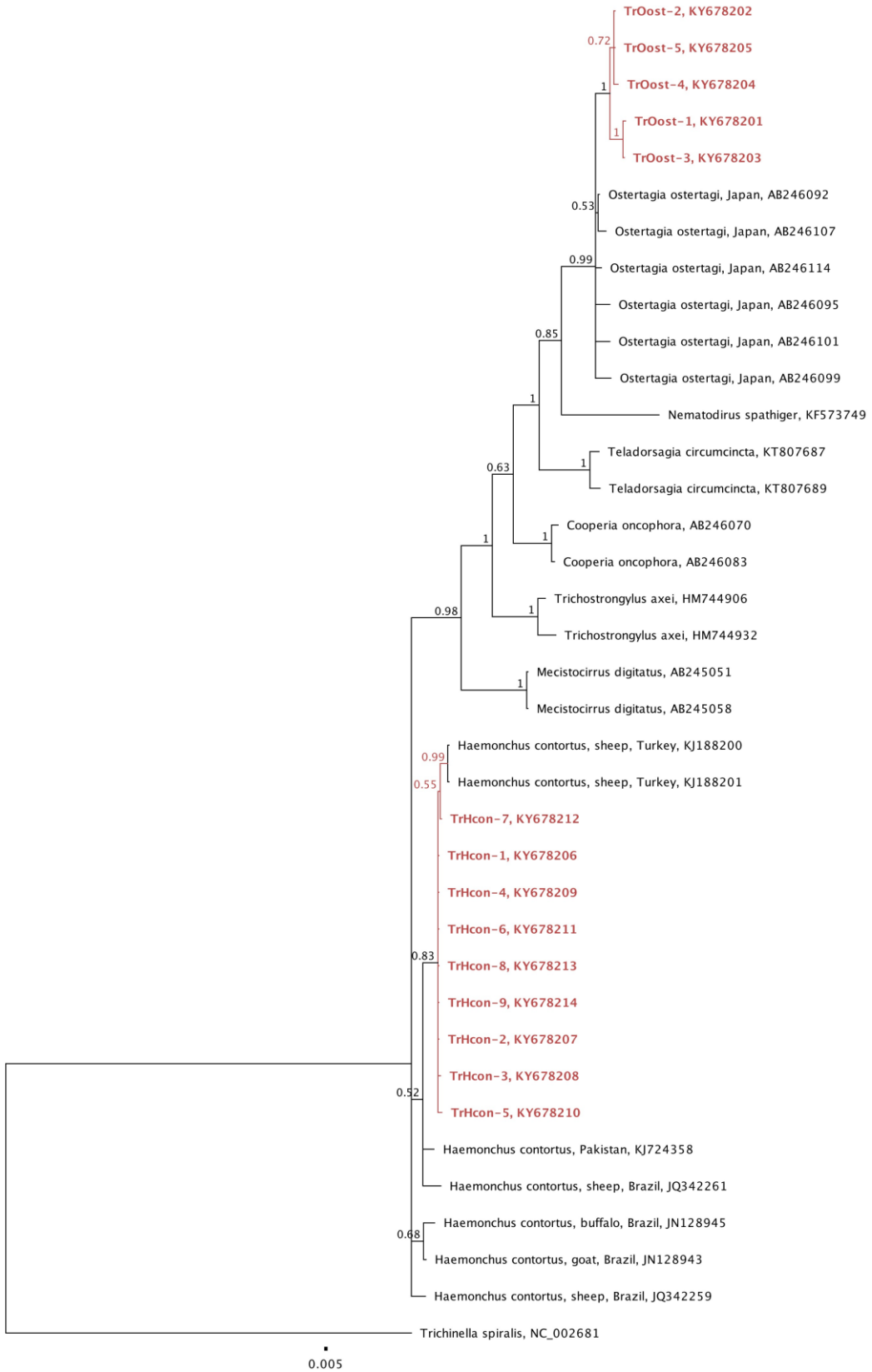
Şekil 4.21 *O. ostertagia ve H. contortus* türlerine ait izolatların mt-COI nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları

Tablo 4.30 *O. ostertagia ve H. contortus* izolatlarının mt-COI sekanslarının ikili hizalama farklılıkları

	Cooperi...	Cooperi...	Mecisto...	Mecisto...	Osterta...	Osterta...	Osterta...	TrOost...	TrOost...	TrOost...	TrOost...	TrOost...	Osterta...	Osterta...	Osterta...	Nemato...	Haemo...	Haemo...	Haemo...	Haemo...	Haemo...	Haemo...	TrHcon...	TrHcon...	TrHcon...	TrHcon...	TrHcon...	TrHcon...	TrHcon...	TrHcon...	TrHcon...	Haemo...	Telador...	Telador...	Trichos...	Trichos...	Trichin...
Cooperia oncophora, ...		99.1%	89.2%	89.2%	86.6%	86.6%	85.6%	86.8%	87.1%	87.6%	87.6%	87.3%	85.9%	86.0%	85.6%	85.6%	87.9%	87.4%	87.9%	87.0%	86.3%	86.3%	86.6%	86.6%	86.6%	86.6%	86.6%	86.8%	86.6%	86.6%	86.8%	86.4%	87.1%	87.8%	88.6%	87.4%	60.4%
Cooperia oncophora, ...	99.1%		89.3%	89.3%	87.3%	87.6%	86.0%	87.6%	87.8%	87.8%	87.8%	87.6%	86.3%	86.5%	86.0%	86.3%	87.9%	87.4%	87.9%	87.4%	86.4%	86.4%	86.6%	86.6%	86.6%	86.6%	86.6%	86.8%	86.6%	86.6%	86.8%	86.4%	87.7%	87.8%	88.8%	87.9%	60.9%
Mecistocirrus digitatus...	89.2%	89.3%		99.8%	85.6%	85.6%	84.3%	85.3%	85.6%	85.3%	85.3%	84.8%	84.7%	85.1%	84.1%	86.3%	87.4%	86.6%	87.4%	88.6%	86.8%	86.8%	85.6%	85.6%	85.8%	85.8%	85.8%	86.1%	85.8%	85.6%	85.6%	87.1%	86.1%	86.6%	87.5%	86.8%	61.6%
Mecistocirrus digitatus...	89.2%	89.3%	99.8%		85.4%	85.4%	84.0%	85.3%	85.6%	85.3%	85.3%	84.8%	84.4%	84.8%	83.9%	86.3%	87.4%	86.6%	87.4%	88.4%	86.8%	86.8%	85.6%	85.6%	85.8%	85.8%	85.8%	86.1%	85.8%	85.6%	85.6%	87.1%	85.9%	86.4%	87.3%	86.6%	61.3%
Ostertagia ostertagi, J...	86.6%	87.3%	85.6%	85.4%		98.1%	97.0%	96.0%	96.3%	97.3%	97.3%	97.0%	97.7%	96.4%	96.6%	87.6%	86.4%	86.6%	85.8%	86.1%	84.7%	84.9%	85.3%	85.3%	85.3%	85.3%	85.3%	85.6%	85.3%	85.3%	85.6%	86.4%	87.8%	88.3%	86.5%	86.5%	58.6%
Ostertagia ostertagi, J...	86.6%	87.6%	85.6%	85.4%	98.1%		97.5%	96.0%	96.3%	97.3%	97.3%	97.0%	97.4%	97.0%	96.9%	86.8%	85.8%	86.1%	85.3%	86.5%	84.7%	84.7%	85.1%	85.1%	85.1%	85.1%	85.1%	85.3%	85.1%	85.1%	85.3%	85.8%	89.2%	89.3%	87.1%	87.5%	59.5%
Ostertagia ostertagi, J...	85.6%	86.0%	84.3%	84.0%	97.0%	97.5%		94.8%	95.0%	96.0%	96.0%	95.8%	96.6%	96.4%	96.3%	85.8%	84.5%	84.8%	84.3%	84.4%	84.1%	84.1%	83.6%	83.6%	83.6%	83.6%	83.6%	83.8%	83.6%	83.6%	83.8%	85.0%	87.1%	87.4%	86.3%	86.3%	58.3%
TrOost-1, KY678201	86.8%	87.6%	85.3%	85.3%	96.0%	96.0%	94.8%		99.8%	97.8%	97.8%	97.3%	95.5%	95.5%	94.5%	85.1%	86.1%	86.1%	85.3%	85.1%	84.6%	84.6%	85.6%	85.6%	85.8%	85.8%	85.8%	85.6%	85.3%	85.1%	85.6%	86.1%	87.9%	87.7%	87.3%	87.0%	54.8%
TrOost-3, KY678203	87.1%	87.8%	85.6%	85.6%	96.3%	96.3%	95.0%	99.8%		98.0%	98.0%	97.5%	95.8%	95.8%	94.3%	85.3%	86.1%	86.1%	85.3%	85.3%	84.3%	84.3%	85.3%	85.3%	85.6%	85.6%	85.6%	85.8%	85.6%	85.3%	85.3%	86.1%	88.1%	88.0%	87.5%	87.3%	55.1%
TrOost-2, KY678202	87.6%	87.8%	85.3%	85.3%	97.3%	97.3%	96.0%	97.8%	98.0%		100%	99.5%	96.8%	96.3%	95.3%	85.8%	85.8%	86.1%	85.3%	85.1%	84.1%	84.1%	85.1%	85.1%	85.3%	85.3%	85.3%	85.6%	85.3%	85.1%	85.1%	85.8%	87.9%	88.3%	87.3%	87.0%	56.0%
TrOost-5, KY678205	87.6%	87.8%	85.3%	85.3%	97.3%	97.3%	96.0%	97.8%	98.0%	100%		99.5%	96.8%	96.3%	95.3%	85.8%	85.8%	86.1%	85.3%	85.1%	84.1%	84.1%	85.1%	85.1%	85.3%	85.3%	85.3%	85.6%	85.3%	85.1%	85.1%	85.8%	87.9%	88.3%	87.3%	87.0%	56.0%
TrOost-4, KY678204	87.3%	87.6%	84.8%	84.8%	97.0%	97.0%	95.8%	97.3%	97.5%	99.5%	99.5%		96.5%	96.0%	95.0%	85.6%	85.6%	85.8%	85.0%	84.8%	83.8%	83.8%	85.1%	85.1%	84.8%	84.8%	84.8%	85.1%	84.8%	85.1%	84.8%	85.6%	87.6%	88.0%	87.3%	87.0%	55.8%
Ostertagia ostertagi, J...	85.9%	86.3%	84.7%	84.4%	97.7%	97.4%	96.6%	95.5%	95.8%	96.8%	96.8%	96.5%		96.0%	96.3%	86.6%	85.3%	85.6%	84.8%	84.9%	84.1%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.6%	84.3%	84.3%	84.6%	85.3%	86.8%	86.9%	85.5%	85.5%	58.2%
Ostertagia ostertagi, J...	86.0%	86.5%	85.1%	84.8%	96.4%	97.0%	96.4%	95.5%	95.8%	96.3%	96.3%	96.0%	96.0%		95.8%	86.3%	86.4%	86.6%	86.1%	86.1%	84.7%	84.7%	85.6%	85.6%	85.6%	85.6%	85.6%	85.8%	85.6%	85.6%	85.8%	86.6%	87.3%	87.6%	86.5%	86.5%	59.0%
Ostertagia ostertagi, J...	85.6%	86.0%	84.1%	83.9%	96.6%	96.9%	96.3%	94.5%	94.3%	95.3%	95.3%	95.0%	96.3%	95.8%		86.3%	85.3%	85.6%	85.0%	84.2%	84.1%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.1%	83.8%	83.8%	84.6%	85.6%	85.9%	86.2%	86.0%	85.5%	59.3%
Nematodirus spathige...	85.6%	86.3%	86.3%	86.3%	87.6%	86.8%	85.8%	85.1%	85.3%	85.8%	85.8%	85.6%	86.6%	86.3%	86.3%		83.2%	83.2%	83.2%	82.1%	81.8%	81.8%	81.1%	81.1%	81.1%	81.1%	81.1%	81.3%	81.3%	81.1%	81.3%	82.4%	85.8%	86.7%	83.4%	82.5%	59.0%
Haemonchus contortu...	87.9%	87.9%	87.4%	87.4%	86.4%	85.8%	84.5%	86.1%	86.1%	85.8%	85.8%	85.6%	85.3%	86.4%	85.3%	83.2%		98.2%	94.5%	95.0%	93.2%	93.2%	94.2%	94.2%	94.2%	94.2%	94.2%	94.2%	94.0%	94.0%	94.2%	95.8%	84.9%	85.0%	87.1%	86.8%	62.8%
Haemonchus contortu...	87.4%	87.4%	86.6%	86.6%	86.6%	86.1%	84.8%	86.1%	86.1%	86.1%	86.1%	85.8%	85.6%	86.6%	85.6%	83.2%	98.2%		96.1%	95.0%	93.2%	93.2%	94.2%	94.2%	94.2%	94.2%	94.2%	94.2%	94.0%	94.0%	94.2%	95.3%	85.5%	85.6%	88.2%	87.9%	62.8%
Haemonchus contortu...	87.9%	87.9%	87.4%	87.4%	85.8%	85.3%	84.3%	85.3%	85.3%	85.3%	85.3%	85.0%	84.8%	86.1%	85.0%	83.2%	94.5%	96.1%		95.8%	94.5%	94.5%	95.5%	95.5%	95.5%	95.5%	95.5%	95.5%	95.3%	95.3%	95.5%	94.8%	85.5%	84.5%	86.5%	86.2%	61.2%
Haemonchus contortu...	87.0%	87.4%	88.6%	88.4%	86.1%	86.5%	84.4%	85.1%	85.3%	85.1%	85.1%	84.8%	84.9%	86.1%	84.2%	82.1%	95.0%	95.0%	95.8%		96.1%	96.1%	96.3%	96.3%	96.3%	96.3%	96.3%	96.5%	96.3%	96.3%	96.5%	95.8%	85.7%	86.5%	86.3%	86.5%	61.8%
Haemonchus contortu...	86.3%	86.4%	86.8%	86.8%	84.7%	84.7%	84.1%	84.6%	84.3%	84.1%	84.1%	83.8%	84.1%	84.7%	84.1%	81.8%	93.2%	93.2%	94.5%	96.1%		100%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.5%	98.3%	98.3%	99.0%	94.2%	84.6%	84.4%	85.4%	85.2%	61.6%
Haemonchus contortu...	86.3%	86.4%	86.8%	86.8%	84.9%	84.7%	84.1%	84.6%	84.3%	84.1%	84.1%	83.8%	84.3%	84.7%	84.3%	81.8%	93.2%	93.2%	94.5%	96.1%	100%		98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.5%	98.3%	98.3%	99.0%	94.2%	84.6%	84.4%	85.4%	85.2%	61.5%
TrHcon-1, KY678206	86.6%	86.6%	85.6%	85.6%	85.3%	85.1%	83.6%	85.6%	85.3%	85.1%	85.1%	85.1%	84.3%	85.6%	84.3%	81.1%	94.2%	94.2%	95.5%	96.3%	98.8%	98.8%		100%	99.8%	99.8%	99.8%	99.5%	99.3%	99.5%	99.8%	95.3%	84.2%	83.5%	85.0%	84.8%	60.7%
TrHcon-4, KY678209	86.6%	86.6%	85.6%	85.6%	85.3%	85.1%	83.6%	85.6%	85.3%	85.1%	85.1%	85.1%	84.3%	85.6%	84.3%	81.1%	94.2%	94.2%	95.5%	96.3%	98.8%	98.8%	100%		99.8%	99.8%	99.8%	99.5%	99.3%	99.5%	99.8%	95.3%	84.2%	83.5%	85.0%	84.8%	60.7%
TrHcon-6, KY678211	86.6%	86.6%	85.8%	85.8%	85.3%	85.1%	83.6%	85.8%	85.6%	85.3%	85.3%	84.8%	84.3%	85.6%	84.3%	81.1%	94.2%	94.2%	95.5%	96.3%	98.8%	98.8%	99.8%	99.8%		100%	100%	99.8%	99.5%	99.3%	99.8%	95.3%	84.2%	83.5%	84.8%	84.5%	60.7%
TrHcon-8, KY678213	86.6%	86.6%	85.8%	85.8%	85.3%	85.1%	83.6%	85.8%	85.6%	85.3%	85.3%	84.8%	84.3%	85.6%	84.3%	81.1%	94.2%	94.2%	95.5%	96.3%	98.8%	98.8%	99.8%	99.8%	100%		100%	99.8%	99.5%	99.3%	99.8%	95.3%	84.2%	83.5%	84.8%	84.5%	60.7%
TrHcon-9, KY678214	86.6%	86.6%	85.8%	85.8%	85.3%	85.1%	83.6%	85.8%	85.6%	85.3%	85.3%	84.8%	84.3%	85.6%	84.3%	81.1%	94.2%	94.2%	95.5%	96.3%	98.8%	98.8%	99.8%	99.8%	100%	100%		99.8%	99.5%	99.3%	99.8%	95.3%	84.2%	83.5%	84.8%	84.5%	60.7%
TrHcon-2, KY678207	86.8%	86.8%	86.1%	86.1%	85.6%	85.3%	83.8%	85.6%	85.8%	85.6%	85.6%	85.1%	84.6%	85.8%	84.1%	81.3%	94.2%	94.2%	95.5%	96.5%	98.5%	98.5%	99.5%	99.5%	99.8%	99.8%	99.8%		99.8%	99.5%	99.5%	95.3%	84.4%	83.7%	85.0%	84.8%	61.0%
TrHcon-3, KY678208	86.6%	86.6%	85.8%	85.8%	85.3%	85.1%	83.6%	85.3%	85.6%	85.3%	85.3%	84.8%	84.3%	85.6%	83.8%	81.3%	94.0%	94.0%	95.3%	96.3%	98.3%	98.3%	99.3%	99.3%	99.5%	99.5%	99.5%	99.8%		99.3%	99.3%	95.0%	84.4%	83.7%	85.3%	85.0%	61.0%
TrHcon-5, KY678210	86.6%	86.6%	85.6%	85.6%	85.3%	85.1%	83.6%	85.1%	85.3%	85.1%	85.1%	85.1%	84.3%	85.6%	83.8%	81.1%	94.0%	94.0%	95.3%	96.3%	98.3%	98.3%	99.5%	99.5%	99.3%	99.3%	99.3%	99.5%	99.3%		99.3%	95.0%	84.2%	83.5%	85.0%	84.8%	60.7%
TrHcon-7, KY678212	86.8%	86.8%	85.6%	85.6%	85.6%	85.3%	83.8%	85.6%	85.3%	85.1%	85.1%	84.8%	84.6%	85.8%	84.6%	81.3%	94.2%	94.2%	95.5%	96.5%	99.0%	99.0%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.5%	99.3%	99.3%		95.3%	84.4%	83.7%	84.8%	84.5%	61.0%
Haemonchus contortu...	86.4%	86.4%	87.1%	87.1%	86.4%	85.8%	85.0%	86.1%	86.1%	85.8%	85.8%	85.6%	85.3%	86.6%	85.6%	82.4%	95.8%	95.3%	94.8%	95.8%	94.2%	94.2%	95.3%	95.3%	95.3%	95.3%	95.3%	95.3%	95.0%	95.0%	95.3%		84.9%	84.7%	86.5%	87.1%	61.7%
Teladorsagia circumci...	87.1%	87.7%	86.1%	85.9%	87.8%	89.2%	87.1%	87.9%	88.1%	87.9%	87.9%	87.6%	86.8%	87.3%	85.9%	85.8%	84.9%	85.5%	85.5%	85.7%	84.6%	84.6%	84.2%	84.2%	84.2%	84.2%	84.2%	84.4%	84.4%	84.2%	84.4%	84.9%		97.3%	87.3%	87.7%	57.7%
Teladorsagia circumci...	87.8%	87.8%	86.6%	86.4%	88.3%	89.3%	87.4%	87.7%	88.0%	88.3%	88.3%	88.0%	86.9%	87.6%	86.2%	86.7%	85.0%	85.6%	84.5%	86.5%	84.4%	84.4%	83.5%	83.5%	83.5%	83.5%	83.5%	83.7%	83.7%	83.5%	83.7%	84.7%	97.3%		87.5%	87.9%	57.0%
Trichostrongylus axei, ...	88.6%	88.8%	87.5%	87.3%	86.5%	87.1%	86.3%	87.3%	87.5%	87.3%	87.3%	87.3%	85.5%	86.5%	86.0%	83.4%	87.1%	88.2%	86.5%	86.3%	85.4%	85.4%	85.0%	85.0%	84.8%	84.8%	84.8%	85.0%	85.3%	85.0%	84.8%	86.5%	87.3%	87.5%		98.0%	56.1%
Trichostrongylus axei, ...	87.4%	87.9%	86.8%	86.6%	86.5%	87.5%	86.3%	87.0%	87.3%	87.0%	87.0%	87.0%	85.5%	86.5%	85.5%	82.5%	86.8%	87.9%	86.2%	86.5%	85.2%	85.2%	84.8%	84.8%	84.5%	84.5%	84.5%	84.8%	85.0%	84.8%	84.5%	87.1%	87.7%	87.9%	98.0%		55.8%
Trichinella spiralis, NC...	60.4%	60.9%	61.6%	61.3%	58.6%	59.5%	58.3%	54.8%	55.1%	56.0%	56.0%	55.8%	58.2%	59.0%	59.3%	59.0%	62.8%	62.8%	61.2%	61.8%	61.6%	61.5%	60.7%	60.7%	60.7%	60.7%	60.7%	61.0%	61.0%	60.7%	61.0%	61.7%	57.7%	57.0%	56.1%	55.8%	

4.7 Mt-COI Gen Bölgesinin Filogenetik Analiz Sonuçları

Moleküler olarak karakterize edilen ve DNA barkodlaması sağlanan türlere ait izolatların Dünyada çeşitli bölgelerden izole edilmiş izolatlarla birlikte filogenetik yapılanmaları Şekil 4.22'de gösterilmiştir. Bayesian filogenisine göre oluşturulan filogenetik çözünürlük yüksek posterior olasılıklarla desteklenmiştir. Çalışmada karakterize edilen *O. ostertagia* ve *H. contortus* haplotipleri arasında arasında ortalama genetik heterojenite sırasıya %3,0±0,6 ve %3,1±0,6 saptanmıştır. Çalışmada karakterize edilen *H. contortus* izolatları filogenetik ağaç (Şekil 4.10) üzerinde görüleceği üzere Kayseri yöresinde koyunlardan izole edilen izolatlarla daha yakın bulunmuş (genetik farklılık %1,1±0,5) ve birlikte cluster oluşturmuştur. Karakterize edilen bu izolatlar ayrıca Pakistan ve Brezilya'dan bildirilen izolatlarla sırasıyla %3,4±1,0 ve %5,7±1,1 farklılık göstermiştir. Türkiye'den ilk kez izole ve karakterize ettiğimiz *O. ostertagia* izolatları ayrı bir grup oluşturmuş ve bu grup içinde iki cluster'da yerleşim göstermiştir. Çalışmada belirlenen bu izolatlar ayrıca GenBank'ta yalnızca Japonya'dan mevcut olan homolog izolatlarla %4,3±0,9 genetik farklılık göstermiştir. Çalışmada saptanan izolatların soy bazında genetik analizlerinde *H. contortus* izolatlarının %17,1±2,6, %18,3±2,6, %18,7±2,8, %20,7±3,0, %22,0±3,3 ve %24,6±3,6 genetik farklılıklarla sırasıyla *Cooperia oncophora, Mecistocirrus digitatus, Trichostrongylus axei, O. ostertagi, Teladorsagia circumcincta* ve *Nematodirus spathiger* türlerine filogenetik olarak yakın olduğu belirlenmiştir. *O. ostertagia* izolatlarının ise %15,2±2,3, %15,8±2,4, %16,3±2,6, %17,3±2,6, %19,8±3,0 ve %20,7±3,0 genetik farklılıklarla sırasıyla *T. circumcincta, Tr. axei, C. oncophora, N. spathiger, M digitatus* ve *H. contortus* türlerine filogenetik olarak yakın olduğu saptanmıştır.

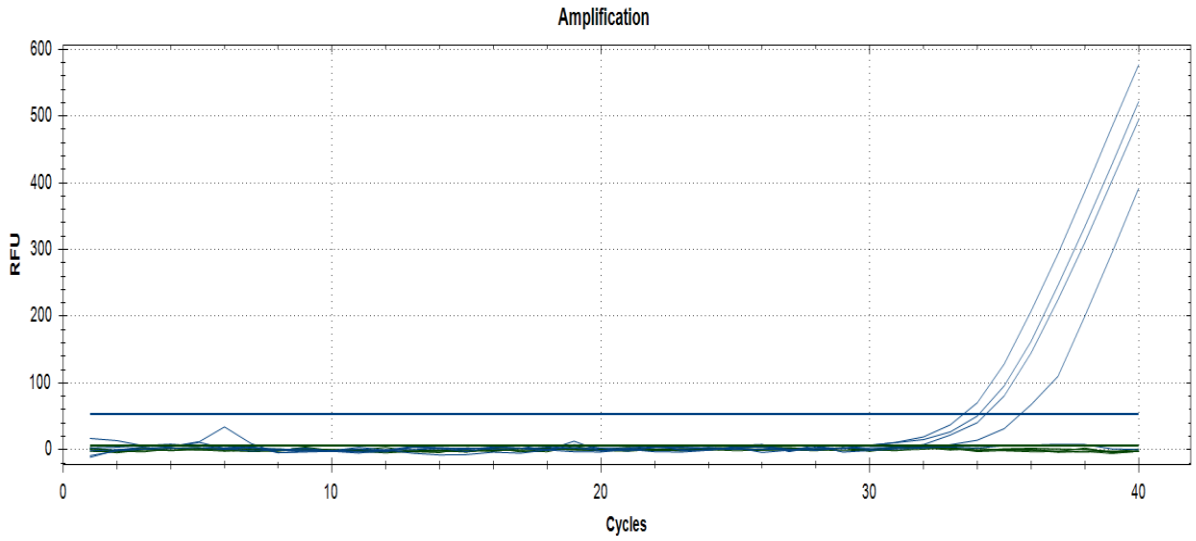


Şekil 4.22 *O. ostertagi* ve *H. contortus* izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) analizine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen izolatlar kırmızı ve kalın karakterde yerleştikleri cluster kırmızı renkte gösterilmiştir. Node'ların önündeki rakamlar Bayesian posterior olasılığını göstermektedir. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

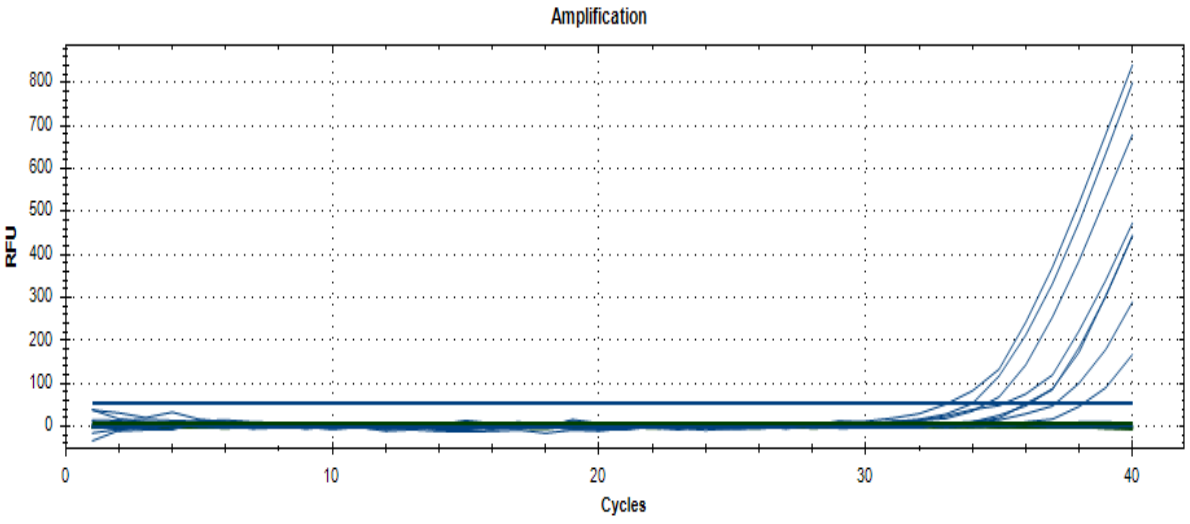
4.8 *H. contortus* Popülasyonlarında Benzimidazol Dirençliliği Sonuçları

4.8.1 Beta Tubulin İzotip-1 Geni Tek Nükleotid Polimorfizminin (SNP) Real Time PCR ile Analiz sonuçları ve Allel Sıklıkları

β tubulin izotip-1 gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacıyla *H. contortus*'un benzimidazol duyarlı ve dirençli alellerin kantitatif amplifikasyonu için TaqMan prob bazlı real time PCR analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri sırasıyla Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'de verilmiştir. İncelenen sığırlarda benzimidazol dirençliliği yönünden saptanan Ct (dR) değerlerine göre duyarlı ve dirençli allel sıklıkları Tablo 4.31'de ve grafik üzerinde Şekil 4.25'de gösterilmiştir. Tablo 4.31'de görüleceği üzere incelenen sığırlarda β tubulin izotip-1 gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmine göre *H. contortus* popülasyonlarında benzimidazol dirençliliği açısandan duyarlı allel sıklığı %80,00±1,99 belirlenirken dirençli allel sıklığı ise %20,00±1,99 olarak tespit edilmiştir. Ct (dR) değerlerine göre göre belirlenen duyarlı ve dirençli allel sıklıklarının istatistiksel analizine göre (Tablo 4.31) duyarlı alell sıklığının dirençli allel sıklığına oranla yaklaşık 4 kat yüksek olduğu belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0,001).



Şekil 4.23 TaqMan prob Real Time PCR analizleri sonucu *H. contortus* duyarlı allellerin amplifikasyon eğrileri

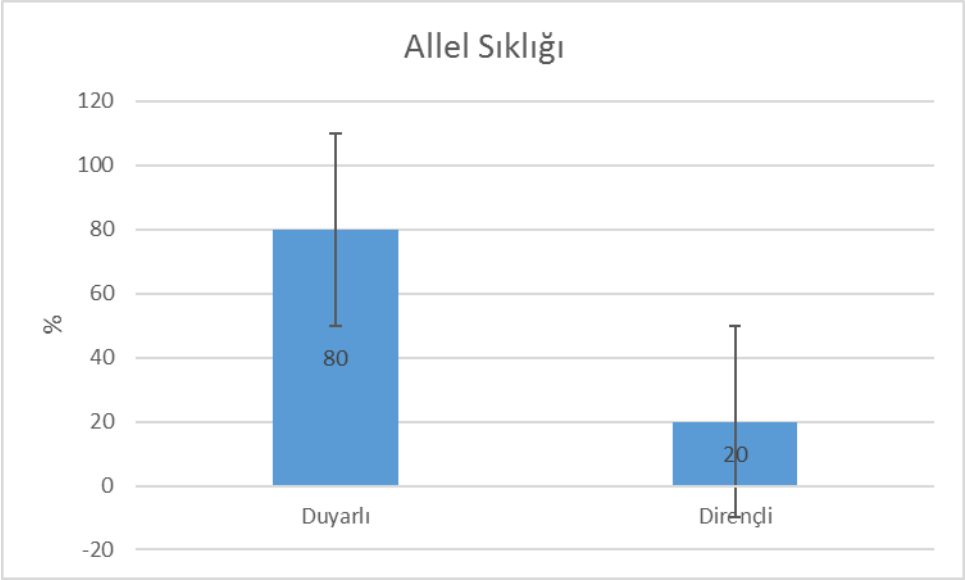


Şekil 4.24 TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizleri sonucu *H. contortus* dirençli allellerin amplifikasyon eğrileri

Tablo 4.31 Benzimidazol duyarlı ve dirençli allel sıklıklarının istatistiksel analizi

Faktör	Allel Sıklığı (%)				t	P
	Ortalama	Std. Hata	Min	Max		
Duyarlı	80,00	1,99	38,00	100,00	-21,443	0,000
Dirençli	20,00	1,99	0,00	62,00		

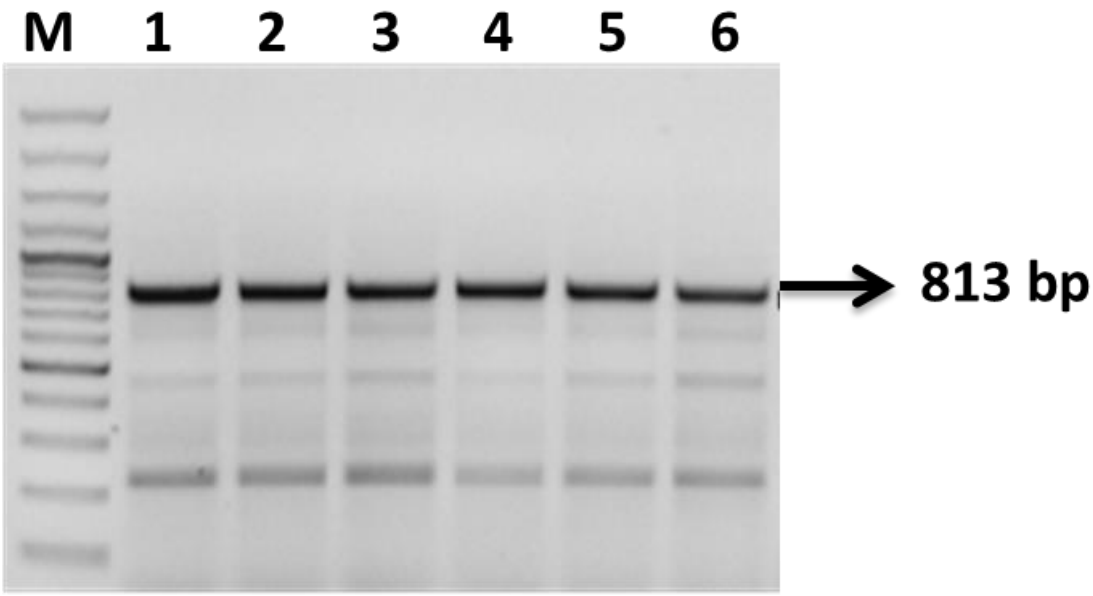
F: Independent Samples testi



Şekil 4.25 Araştırma yöresinde benzimidazol duyarlı ve dirençli *H. contortus* nesillerinin allel sıklıklarına göre dağılımı.

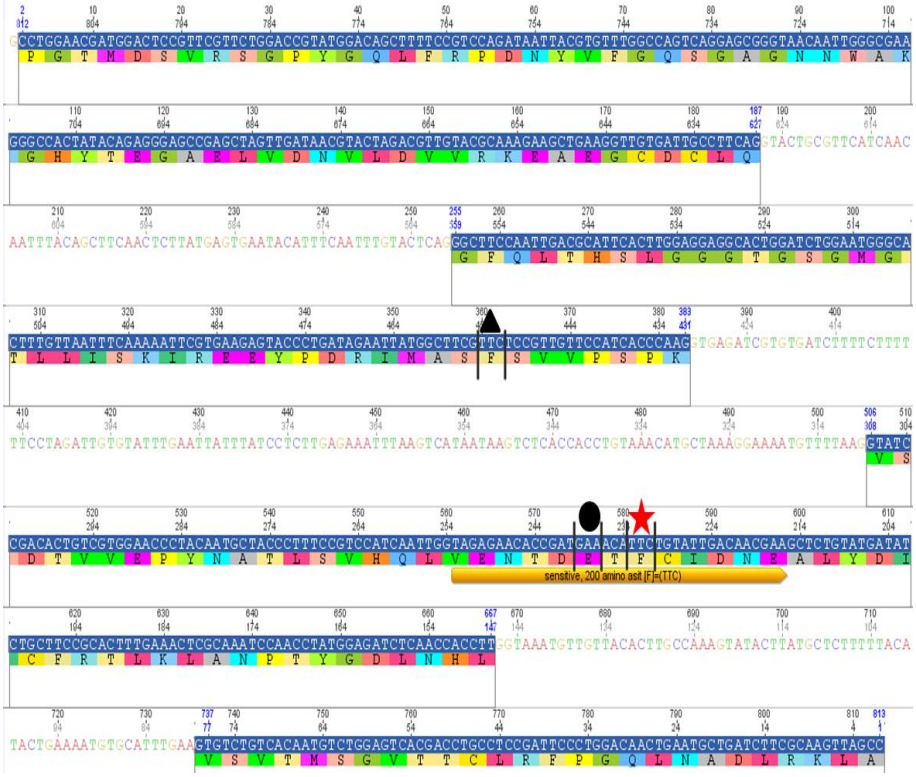
4.8.2 β tubulin izotip-1 Geninin Amplifikasyon ve Sekans Analiz Sonuçları

Real time PCR'da duyarlı allel sıklığı %100 (10 izolat), dirençli alleller sıklığı >%50 (8 izolat) belirlenen toplam 18 izolatın β tubulin izotip-1 genini amplifiye eden HcTub-s5 ve HcTub-as5 primerleri ile PCR amplifikasyonu sonucu tüm örneklerde 813 bp amplikonların oluştuğu belirlenmiştir. Bazı örneklere ait amplikonların %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.26'da verilmiştir. Şekil 4.26'da görüleceği üzere hedef gen bölgesinin yanında ilgili primerlerin bazı non-spesifik bağlanmalar da gösterdiği belirlenmiştir.

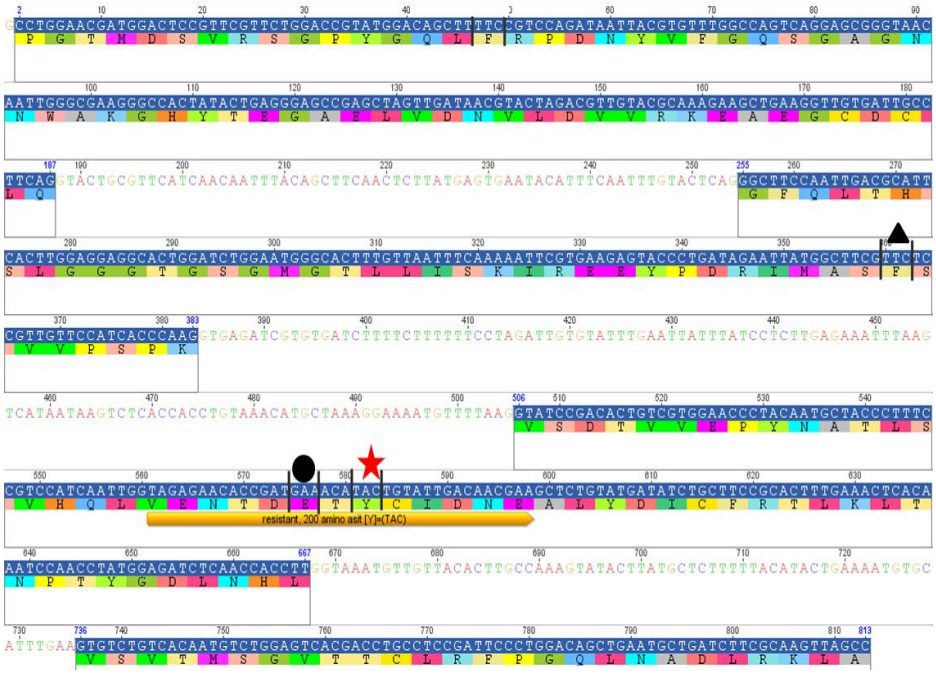


Şekil 4.26 *H. contortus* izolatlarının β tubulin izotip-1 gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 1-3: Duyarlı allel sıklığı %100 belirlenen izolatlara ait amplikonlar; 4-6: Dirençli allel sıklığı >50 belirlenen izolatlara ait amplikonlar

β tubulin İzotip Tip 1 gen bölgesi yönünden klonlama sonrası elde edilen rekombinant plazmidler, vektör spesifik primer çifti ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Elde edilen nükleotid dizileri vektör sekansı ile alignment yapılarak ilgili gen bölgesinin sekansları elde edilmiştir. Sekans analizleriyle β tubulin izotip-1 gen bölgesi yönünden Real Time PCR analizlerinde allel sıklığı %100 belirlenen 10 izolatın tümü ile dirençli allel sıklığı >50 saptanan 8 izolattan 5'ünde aminoasit dizisinde 167., 200. ve 198. kodonlarında benzimidazol duyarlı nesillerdeki sırasıyla fenilalanin (TTC), fenilalanin (TTC) ve glutamin (GAA) amino asitleri belirlenmiştir (Şekil 4.27). Dirençli allel sıklığı >50 belirlenen ve sekans analizleri gerçekleştirilen 8 izolattan kalan diğer 3'ünün ise 200. kodonda tek nükleotid polimorfizmi gösterdiği ve fenilalanin (TTC) amino asidinin tirozin amino asitine (TAC) dönüştüğü saptanmıştır. İlgili üç izolatın 167. ve 198. kodonlarında ise polimorfizm belirlenmemiştir (Şekil 4.28).



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



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

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyanın hemen her bölgesinde yetiştiriciliği yapılabilen sığırlar süt ve et üretiminin başlıca kaynağı olup insanlar tarafından tüketilen proteinin yaklaşık %60'nı karşılamaktadır. Dünya süt üretiminin hemen hemen tamamına yakını (%90), et üretiminin ise %38'den fazlası sığırcılık sektöründen sağlanmaktadır. Subtropikal iklim kuşağında yer alan Türkiye'nin ekonomisinde sığır yetiştiriciliği çok önemli paya sahip olmasına karşın son yıllarda sığır sayısında önemli azalmalar olmuştur. Türkiye'de hayvancılığın gelişmesini olumsuz yönde etkileyen barınak, bakım ve besleme gibi yetiştiricilik hatalarının yanında, bakteriyel, viral ve paraziter orijinli hastalıklar halen daha hüküm sürmektedir. Modern sığırcılık günümüzde dünyada temel ilke olarak kabul edilen "sürü sağlığı" konsepti çerçevesinde incelendiğinde paraziter enfeksiyonların başlıca tehditler arasında yer aldığı görülmektedir. Bu enfeksiyonlar içerisinde de mide-bağırsak sistemine yerleşen trichostrongylid nematodların payı oldukça yüksektir. Trichostrongylid nematodlar içerisinde abomasuma yerleşen *Ostertagia ostertagi* ve *Haemonchus* türleri (*H. contortus* ve *H. placei*) en yaygın türlerin başında gelmekte olup hastalığa bağlı ekonomik kayıplarda en önemli türler olarak bilinmektedirler. Sindirim sistemine yerleşen bu nematodlar gerek biyolojileri gereği gerekse oluşturdukları enfeksiyonların genellikle subklinik seyirli olmaları dolayısıyla çoğunlukla ihmal edilmektedirler. Enfeksiyonlar bu haliyle düşük seviyelerde ama uzun süre verim kayıplarına neden olmaktadırlar. Verim kayıpları bireysel anlamda dikkat çekmese de çiftlik, bölge ya da ülke hayvancılığı bazında ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadırlar. Ayrıca düşük düzeylerdeki enfeksiyonların duyarlı hayvan grupları için enfeksiyon kaynağı olma durumu da ayrı bir problem dinamiğini oluşturmaktadır. Özellikle gençlerde ve parazitle ilk kez karşılaşan sığırlarda meydana gelen enfeksiyon tablosu son derece şiddetli olabilmektedir. Şiddetli enfeksiyonlar başka olumsuz faktörlerle (bakım-beslemede yetersizlik, olumsuz barınak koşulları, diğer enfeksiyonların varlığı, immun yetmezlikler vb.) birleştiğinde uzun ve pahalı tedavi süreçlerini beraberinde getirmekte olup bazen ölümle sonuçlanabilmektedir (1, 5, 8, 40, 44, 169).

Türkiye'nin, gerek iklimsel gerekse ekolojik faktörler yönünden nematodların serbest yaşam safhalarının gelişmesi için çok uygun olması, hayvancılığın bilinçsiz bir şekilde yapılması, takip, kontrol ve mücadele stratejilerinin yetersiz olması gastrointestinal nemotad enfeksiyonlarının yayılışını artırmakta ve dolayısıyla oluşturdukları verim kayıplarının da

yükselmesine neden olmaktadır (170,171). Türkiye'de günümüze kadar sığırlarda gastrointestinal nematod enfeksiyonları üzerine çalışmalar daha çok nekropsi ve dışkı muayenesi temelinde yapılmış olup moleküler prevalans ve genotipleme çalışmaları bulunmamaktadır. Türkiye'de sığır ve mandalarda sadece *H. contortus* türünün varlığı bildirilmekte olup (44) bu parazitin prevalansı; Türkiye'nin değişik bölgelerinde %10,99-22 (6), Marmara Bölgesi'nde %47,9 (8), İç Anadolu Bölgesi'nde %8,3 (9), Kayseri yöresi sığırlarında %4 (13), Afyon yöresinde %20,83 (12), Elazığ yöresinde %5 (15), Kars ve Konya yöresinde %8 (11, 14), Samsun yöresinde %23,9 (7) ve Bursa yöresinde %12,72 (10) oranlarında rapor edilmiştir. Türkiye'deki sığırlardaki *O. ostertagi* prevalansı ise; Ankara'da % 92,86 (5), Türkiye'nin değişik bölgelerinde %22 (6), Samsun yöresinde %65,5 (7), Marmara Bölgesi'nde %87,5 (8), İç Anadolu Bölgesi'nde %20,8 (9), Bursa'da %27,27 (10), Kars'ta %92 (11), Afyon'da %10,30 (12), Kayseri'de %35 (13), Konya'da %3 (14) ve Elazığ'da %63,26 (15) oranlarında bildirilmiştir.

Güralp (5), Ankara'da sığır abomasumu üzerinde yaptığı bir çalışmada bulduğu türlerin tamamının *Ostertagia* cinsine bağlı türler olduğunu bildirmiş ve bunların %92,86'sının *O. ostertagi,* %4,76'sının *O. marshalli,* %2,38'inin ise *O. occidentalis* olduğunu saptamıştır. Ergün (6), Türkiye koyun-keçi ve sığırlarında bulunan parazitlerin *Toxocara vitulorum* % 7,6, *Chabertia ovina* % 2,6, *Oesophagostomum radiatum, Oe. venulosıtm, Oe. columbianum, Bunostomum trigonocephalum, B. phlebotomum, Trichostrongylus colubriformis* %2,5, *T. probolurus* %33, *T. capricola* %1, *T. vitrirrus* %80, *T. axei, O. ostertagi* %22, *O. circumcincta* %15,4-25, *O. trifiırcata, O. occidentalis, O. lyrata, Camelostrongylus mentulatus, Marshallagia marshalli* %13,20, *Cooperia oncophora, Haemonchus contortus* %10,99-22, *Nematodirus filcollis, N. abnormalis* %3,22 ve *N. spatiger* %23,4-30 oranlarında rapor edildiğini bildirmiştir. Merdivenci (172), Türkiye'nin değişik bölgelerindeki sığırlarda; *C. ovina, O. radiatum, O. venulosum, O. columbianum, B. trigonocephalum, B. phlebotomum, T. colubriformis, T. capricola, T. vitrinus, T. axei, O. ostertagi, O. circumcincta, O. trifiırcata, C. oncophora, H contortus, N. füicollis, N. spathiger, N. helvetianus, T. ovis ve Grosspiculagia lyrata* türlerinin bulunduğunu rapor etmiştir. Güralp (173) sığırlarda bulunan başlıca trichostrongil türlerini *Ostertagia ostertagi, O. occidentalis, O. bisonis, O. orloffi, O. crimensis, Haemonchus placei, H. similis, H. contortus, Trichostrongylus axei, T. colubriformis, T. longispicularis, Cooperia punctata, C pectina, C. oncophora, C. mcmasteri* ve *Nematodirus helvetianus* şeklinde bildirmiştir. Celep ve ark. (7), Samsun yöresinde

yaptıkları helmintolojik araştırmada incelenen 142 sığırda *Ostertagia* spp. %65,5, *Cooperia* spp. %45,8, *Oesophagostomum* spp. %32,4, *T. axei* %31,0, *H. contortus* %23,9, *Bunostomum phlebotomum* %15,5, *Setaria cervi* %15,5, *C. bovis* %12,0, *Trichostrongylus* spp. %8,5, *Gongylonema pulchrum* %6,3, *Chabertia* spp. %4,9, *Trichuris* spp. %4,2 ve *N. helvetianus* %2,1 oranlarında bulduklarını rapor etmişlerdir. Günay (8), Marmara bölgesinde yaptığı çalışmada, bir yaşından küçük sığırların % 100'ünün ve bir yaşından büyük sığırların ise % 93.8'inin bir veya daha fazla mide-bağırsak nematodu ile enfekte olduğunu ve nematod türlerinin *O. ostertagi* %87,5, *T. axei* %75, *O. lyrata* %31,3, *O. circumcincta* %6,3, *O. trifurcata* %2,1, *C punctata* %27,1, *H. contortus* %47,9, ince bağırsaklarda *C. oncophora* %85,4, *C. punctata* %47,9, *C. mcmasteri* %54,2, *T. vitrinus* %10,4, *T. longispicularis* %6,3, *T. colubriformis* %2,1, *N. helvetianus* %20,8, *T. vitulorum* %8,3, *C. bovis* %8,3, *B. phlebotomum* %33,3, *T. ovis* %33,3, *Oe. radiatum* %50, *Chabertia ovina* %8,3 oranlarında olduğunu bildirmiştir. Tiğin ve ark. (9), İç Anadolu Bölgesi sığırlarının gastrointestinal nematod faunasını belirlemek amacıyla yaptıkları araştırmada nematod türlerini *C. oncophora* %87,5, *T. ovis* %29,1, *O. radiatum* %25, *N. helvetianus* %25, *O. ostertagi* %20,8, *C. ovina* %20,8, *O. circumcincta* %16,16, *O. occidentalis* %12,5, *O.marshalli* %12,5, *H. contortus* %8,3, *C macmasterï* %8,3, *Cooperia* spp. %8,3, *Oesophagostomum* spp. %8,3, *T. discolor* %8,3, *T. skrjabini* %8,3, *B. phlebotomum* %4,1, *O. columbianum* %4,1, *T. axei* %4,1, *Ostertagia* spp. %4,1 ve *Haemonchus* spp. %4,1 şeklinde rapor etmişlerdir. Ergül (10), Bursa yöresinde yaptığı araştırmada, sığırlarda *Ostertagia* %27,27, *Haemonchus* %12,72, *Cooperia* %25,45, *Nematodirus* %5,45, *Trichostrongylus* %3,63, *Bunostomum* %3,63, *Capillaria* %1,81, *Oesophagostomum* %35,54, *Trichuris* %18,18 ve *Chabertia* %3,63 pozitifliği bildirmişlerdir. Umur (11), Kars yöresinde 50 sığırın gastrointestinal organlarını incelemiş ve muayene edilen tüm hayvanların gastrointestinal nematodlarla enfekte olduğunu bildirmiştir. Enfekte sığırlarda nematod türlerinin *O. ostertagi* %92, *T. axei* %58, *C. oncophora* %48, *C. pectinata* %24, *C. mcmasteri* %14, *Oe. venulosum* %22, *M. marshalli* %14 ve *Trichuris discolor* %14 oranlarında olduğunu saptamıştır. Yıldırım ve ark. (13), Türkiye'nin değişik yerlerinden temin edilip Kayseri'de kapalı sistemde besiye tabi tutulan 200 sığırdan alınan dışkı örneklerinde dışkı kültürü sonucu en fazla rastlanan larvaların *Ostertagia* spp. (%35), *Cooperia* spp. (%15), *Oesophagostomum* spp. (%15), *Bunostomum* spp. (%13), *Nematodirus* spp. (%7), *Haemonchus* spp. (%4) ve *Trichostrongylus* spp. (%4) olduğunu bildirmişlerdir. Elazığ yöresi sığırlarında mide-bağırsak nematodlarının yayılışını belirlemek amacıyla Şubat

1998-Şubat 2000 tarihleri arasında yapılan çalışmada (15), 75 sığıra ait mide bağırsak sistemi incelenmiş ve incelenen 75 sığırın 49'u (%65,34) nematodlarla enfekte bulunmuş ve 19 tür nematod saptanmıştır. Enfekte sığırlarda en çok görülen türler *O. ostertagi* (%63,26), *C. oncophora* (%32,65), *G. pulchrum* (%20,4), *O. lyrata* (%16,32), *O. circumcincta* (%10,2), *H. contortus* (%10,2) ve *Trichuris ovis* (%10,2) olarak belirlenmiştir. Gökçen ve Güçlü (14), Konya bölgesindeki sığırlarda bulunan gastrointestinal nematodları belirlemek amacıyla toplam 100 adet sığır organı incelenmiş ve inceleme sonunda enfekte hayvanlardan 3205'i erkek, 2975'i dişi olmak üzere toplam 6180 adet nematod toplamışlardır. Toplanan nematodları *H. contortus* (%8), *O. marshalli* (%4), *O. ostertagi* (%3), *O. trifurcata* (%2), *O. circıımcincta* (%1) ve *T. axei* (%1), *C. oncophora* (%3), *N. filicollis* (%1) ve *S. cervi* (%1), *T. ovis* (%3), *T. discolor* (%2), *T. globıılosa* (%1), *Oe. radialıım* (%1), *Oe. columbianum* (%1) ve *C. ovina* (%1) olarak identifiye etmişlerdir. Sevimli ve ark. (12) Afyonkarahisar'da toplam 985 baş sığıra ait dışkı örneği ve 24 baş sığırın mide-bağırsakları muayene etmişler ve dışkı muayenesi ile sığırların %26,39'nda Strongyle tip yumurtalara rastlamışlardır. Yapılan dışkı kültürlerinde bulunan larva cinslerini *Haemonchus* %25,25, *Trichostrongylus* %23,71, *Nematodirus* %16,49, *Ostertagia* %10,30, *Cooperia* %8,76, *Bunostomum* %6,70, *Oesophagostomum* %6,18 ve *Chabertia* %2,57 olarak belirlemişlerdir. Enfeksiyondan sorumlu türlerin belirlenmesi için yapılan mide-bağırsak muayenesinde, *H. contortus* ve *Oe. venulosum* %20,83, *O. radiatum* %16,66, *C. onchophora* ve *O. ostertagi* %8,3, *O. trifurcata, C. punctata* ve *C. ovina* %4,16 olarak saptamışlardır.

Çalışmamızda konvansiyonel dışkı muayenesi sonucunda incelemesi yapılan toplam 920 sığırın 210'u (%22,8) Trichostrongylid yumurtaları yönünden pozitif bulunmuştur. Araştırma yöresine göre Trichostrongylid yumurtaları ile pozitiflik en yüksek %25,4 ile Kayseri yöresinden örneklenen sığırlarda belirlenmiş bunu sırasıyla %22,1, %21,0 ve %20,5 ile Yozgat, Nevşehir ve Kırşehir yörelerinden örneklenen sığırlar izlemiştir. Çalışmamızda Türkiye'de ilk defa Trichostrongylid yumurtaları ile pozitif saptanan örneklere ait genomik DNA izolatlarının *O. ostertagi* ve *H. contortus* türleri yönünden sybergreen real time PCR ile analizleri yapılmış ve analiz sonuçlarına göre Trichostrongylid yumurta pozitif 210 örneğin 34'ünde *O. ostertagi*, 58'inde *H. contortus* ve 23'ünde her iki türle miks enfeksiyon pozitifliği belirlenmiş ve incelenen toplam 920 sığır örneği bazında iki tür için moleküler prevalans oranları sırasıyla %6,2 ve %8,8 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda iller bazında (Kayseri, Nevşehir, Yozgat, Kırşehir) *O. ostertagi* ve *H. contortus* için elde edilen moleküler prevalans

sonuçları sırasıyla %5,5-9,2 ve %7,4-9,7 aralığında saptanmıştır. *H. contortus* için belirlenen moleküler prevalans oranının, Türkiye'de dışkı ve nekropsi incelemesiyle elde edilmiş bazı çalışma (13,15) sonuçlarından yüksek bulunduğu, bazı çalışma (9,11,14) sonuçlarıyla paralel seyrettiği ve bazı çalışma (6-8,10,12) sonuçlarına göre ise düşük olduğu dikkati çekmiştir. Buna karşın *O. ostertagi* için belirlenen moleküler prevalans oranının ise Türkiye'de Gökçen ve Güçlü (14) ile Sevimli ve ark. (12) tarafından yapılmış çalışmalar dışındaki tüm çalışmalara (6,7,9-11,13,15,173) göre oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Çalışmalar arasındaki bu farklılığın, çalışmanın yapıldığı bölgenin coğrafik özelliklerinden, mevsimsel farklılıklardan, hayvanların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerinden, çalışmamızda kullandığımız real time PCR tekniğinin diğer teşhis yöntemlerine göre sensitivite ve spesifitesinin son derece yüksek olması gibi farklılıklardan kaynaklanabileceği kanaatine varılmıştır. Ayrıca bunun sebebi olarak geçen zaman içinde yetiştiricilerin belirli düzeyde bilinçlenerek koruyucu antelmentik tedaviye önem vermeleri ve entansif yetiştiriciliğe geçiş eğiliminin artması gösterilebilir. Öte yandan gerek Türkiye'de gerekse dünyada genel olarak bakıldığında dışkı bakısı ve nekropsi sonuçlarına göre sığırlarda *O. ostertagi*'ye *H. contortus*'a oranla daha yoğun rastlandığı görülmüştür. Ancak çalışmamızda, moleküler sonuçlara göre daha çok koyunlarda görülen *H. contortus* prevalansının *O. ostertagi* prevalansına göre biraz daha fazla olduğu dikkati çekmiştir. Bunun sebebinin de çalışma bölgelerinde küçük ve büyük ruminantların ortak meralarda otlatılmasına bağlı olarak, *H. contortus* enfeksiyonun sığırlara bulaşımının koyun ve keçilerden de kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda yaş gruplarına göre sığırlarda genel olarak Trichostronylid yumurta pozitifliği ile *H. contortus* ve *O. ostertagi* pozitifliği en yüksek 4-12 ay grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla ≤3 ay ve >12 ay grupları izlemiştir. Yaş gruplarına göre gerek Trichostronylid yumurta pozitifliği gerekse *H. contortus* ve *O. ostertagi* pozitifliği 4-12 ay ve ≤3 ay yaş grupları ile >12 ay grubu arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p<0,001$) bulunurken 4-12 ay ve ≤3 ay yaş grupları arasındaki farklılık ise önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur. Özellikle gençlerde ve parazitle ilk kez karşılaşan hayvanlarda meydana gelen enfeksiyon tablosu erişkinlerdekine oranla son derece şiddetli olabilmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgular açıkça genç hayvanların yetişkin hayvanlara göre gastrointestinal nematod enfeksiyonlarından çok daha fazla etkilendiklerini ortaya koymaktadır. Yaş gruplarına göre elde edilmiş bu sonuçların dünyada Anene ve ark. (174), Waruiru ve ark. (175), Regassa ve ark. (176) ve Awraris ve ark. (177) tarafından yapılmış çalışma

sonuçlarıyla paralellik gösterdiği görülmüştür. Genç hayvanlarda yetişkin hayvanlara oranla daha fazla enfeksiyon saptanmasının, genç hayvanların immun sistemlerinin henüz daha tam anlamıyla gelişmediği, buna karşın yetişkin hayvanların enfeksiyonları atlamalarından dolayı bağışıklık sistemlerinin daha güçlü olduğu şeklinde yorumlanabilir. Ancak bu sonuçların aksine, Bilal ve ark. (178), Maichomo ve ark. (179) ve Marskole ve ark. (180) tarafından yapılan çalışmalarda yaş grupları arasında trichostrongil yumurtalarının dağılımı arasında istatistiksel bir fark olmadığı rapor edilmiştir. Sonuçlar arasındaki bu farklılıkların çalışma yapılan bölgelerin ekolojik durumları, hayvanların kondisyon durumları, hayvancılık işletmelerinin durumları ve örneklenen hayvan sayılarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda sığırların cinsiyetine göre hem Trichostronylid yumurta pozitifliği hem de *H. contortus* ve *O. ostertagi* pozitifliğinin dağılımındaki farklılık istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Çalışmamızda cinsiyete bağlı elde ettiğimiz bu bulguların dünyada Awraris ve ark. (177), Bilal ve ark. (178), Fikru ve ark. (181) ve Marskole ve ark. (180) gibi araştırıcılar tarafından yapılmış çalışma sonuçlarıyla benzer olduğu görülmüştür. Çalışmamızda ayrıca Holstein, Simental, Montofon, Yerli ve Melez ırklara ait örneklerde hem Trichostronylid yumurta pozitifliği hem de *H. contortus* ve *O. ostertagi* pozitifliğinin dağılımında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çalışmamızda dışkı karakterine göre normal, ishalli ve kanlı ishalli dışkı örneklerinde Trichostronylid yumurta pozitifliği sırasıyla %18,3, %65,2 ve %61,9 oranında bulunmuştur. Dışkı karakterine göre gerek Trichostronylid gerekse *H. contortus* pozitifliğinin dağılımı ishalli ve kanlı ishalli dışkı gruplarında normal dışkı grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bulunmuş ($p<0,001$), ishalli ve kanlı ishalli gruplar arasındaki farklılık ise önemsiz çıkmıştır ($p>0,05$). İncelenen sığırların dışkı karakterlerine göre *O. ostertagi* prevalansı ise ishalli grupta, kanlı ishalli ve normal dışkı gruplarına göre yüksek belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Kanlı ishalli ve normal dışkı grupları arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Dışkı karakterine göre parazit türüne bağlı bu istatistiksel farklılığın *O. ostertagi* ve *H. contortus'*un patogenezindeki farklılıklara bağlı olabilecği düşünülmektedir. Şöyle ki; *O. ostertagi* larvaları abomasumdaki paryetal hücrelerin yapısını bozarak asidik salgı üretimine engel olmakta, buna bağlı olarak pH6 ve üzerinde pepsinojen enzimi, pepsine dönüşememekte, emilerek kan dolaşımına karışmakta, protein sindirimi aksamaktadır. Abomazumdaki asidik ortamın kaybolmaya başlaması,

bakteriyostatik dengeyi bozmakta ve normal flora bozulmaya başlamaktadır. Bu tablo akut ishal, kondisyon kaybı ve iştahsızlıkla devam etmektedir (28). Dolayısıyla ishalli gruptaki sığırlarda *O. ostertagi* pozitifliğinin yüksek belirlenmesi, kanlı ishalli ve normal dışkı gruplarındaki sığırlarda ise istatistiksel farkın olmaması yukarıdaki patogenezine bağlı olarak açıklanabilmektedir. Benzer şekilde buzağı ve danalarda *H. contortus* enfeksiyonlarında abomazum mukozasına gelen genç larvalar üçüncü gelişme döneminden sonra L4 haline geçmektedirler. Bu evrede larvaların ağız yapısı, abomazum mukozasından kan emebilecek duruma gelmektedir. Larvaların sayısına bağlı olarak abomazum mukazasında, çok şiddetli doku irritasyonları ve reaksiyonlar meydana gelebilmektedir. Aynı zamanda bazı kan parametrelerinde değişiklikler gözlenmekte ve bu durum hem anemik duruma hem de sindirim-emilim sendromlarının bozulmasına neden olmaktadır (51). Parazitin biyolojisinden yola çıkarak özellikle ishalli ve özellikle de ostertagiosis'ten farklı olarak kanlı ishalli sığırlarda *H. contortus* prevalansının normal dışkılı hayvanlara göre çok daha yüksek çıkmasının sebebinin de bundan kaynaklanabileceği kanaatine varılmıştır.

Gastro intestinal nematodlarında kışı merada geçiren larvalar, ilk otlatma sezonunda meraya çıkan genç hayvanlar için enfeksiyon kaynağını oluşturmaktadırlar. Yaşlı ve genç hayvanlar aynı merayı kullandıklarında genç hayvanların mera sezonu sonunda enfeksiyonu pik düzeyde olmaktadır. Çünkü yaşlı hayvanlar enfeksiyonun yayılmasında ve mera kontaminasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Yaşlı hayvanlarda meraya çıkmadan önce bahar yükselmesi (spring rise) ile hipobiyotik larvalar gelişmeye yeniden başlamakta, otlatma sezonunun ilerlemesiyle gastro intestinal nematodlara karşı immunite gelişmektedir (12). Hansen ve Perry'ye (182) göre gastro intestinal nematod enfeksiyonlarında EPG düzeyi 50-200 arasında ise enfeksiyon hafif şiddette, 200-800 arasında ise orta şiddette, 800'den yukarı ise ağır enfeksiyon meydana gelmektedir. Çalışmamızda Trichostronylid yumurtaları ile pozitif belirlenen sığırlarda ortalama EPG değeri 460,1±34,0 (min:50,00, max:1000,00) belirlenmiştir. Ortalama EPG değerleri sığırların yaş gruplarına göre en yüksek <3 ay grubunda belirlenmiş, bunu 4-12 ay ve >12 ay yaş grupları izlemiştir. >12 ay yaş grubu ile <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p<0,001$) bulunurken, <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları arasındaki farklılık ise önemsiz ($p>0,05$) belirlenmiştir. Yaş gruplarına göre sığırlarda genel olarak Trichostronylid yumurta pozitifliği ile *H. contortus* ve *O. ostertagi* pozitifliğindeki istatistik sonuçlarına tam olarak benzerlik gösteren bu tablo dünyada Anene ve ark. (174), Waruiru ve ark. (175), Regassa ve ark. (176)

ve Awraris ve ark. (177) tarafından yapılmış çalışma sonuçlarıyla uyumluluk göstermiş olup özellikle buzağı ve genç sığırların gelişen hastalık için risk altında olduğunu ortaya çıkarmıştır. Benzer şekilde sığırların cinsiyetine göre EPG değerleri dişilerde ortalama 440,9, erkeklerde ise 494,8 saptanmış ve EPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımında istatistiksel bir farklılık ($p>0,05$) görülmemiştir. Benzer sonuçlar Awraris ve ark. (177), Bilal ve ark. (178), Fikru ve ark. (181) ve Marskole ve ark. (180) tarafından da bildirilmiştir. Ortalama EPG değeri holstein, simental, montofon, yerli ve melez ırkı sığırlarda sırasıyla 493,8, 441,7, 363,6, 358,8 ve 677,1 belirlenmiştir. EPG değerlerinin sığırların ırkına göre dağılımında da pozitiflik oranlarındaki istatistiksel oranlarla birebir benzerlik söz konusu olmakla birlikte ırka göre EPG düzeyleri arasında istatistiksel bir farklılık ($p>0,05$) görülmemiştir. Çalışmamızda dışkı karakterine göre normal, ishalli ve kanlı ishalli dışkı örneklerinde Trichostronylid yumurta pozitifliğindeki istatistiksel oranlara paralel olarak ortalama EPG değeri kanlı ishalli ve ishalli dışkılarda normal dışkı örneklerine göre yüksek belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Kanlı ishalli ve ishalli dışkı grupları arasındaki farklılık ise istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur. Bu durumun da trichostrongylid nematodların biyolojilerinin doğal bir sonucu olarak şekillendiği düşünülmektedir.

Trichostrongylid nematodların duyarlı ve başarılı identifikasyonları bu hastalıkların erken dönemde belirlenmeleri, tedavi ve kontrol stratejilerinin belirlenmesinde kilit rol üstlenmektedir (183). Çiftlik hayvanlarında gastrointestinal nematodların teşhisinde diyare, anemi, üreme oranında azalma, canlı ağırlık kaybı, et, süt ve yün üretiminde azalma gibi klinik belirtilerden yararlanılmaktadır. Ancak klinik teşhis ile hastalık sebebi ajanların ve miks enfeksiyonların belirlenebilmesi mümkün değildir. Nitekim sığırlarda anemi, enteritis ve bununla bağlantılı diyare, canlı ağırlık kaybı ve benzeri klinik belirtiler Trichostrongyloidae ailesindeki *Haemonchus, Teladorsagia, Ostertagia, Nematodirus, Cooperia, Trichostrongylus* ve Strongyloidea ailesindeki *Oesophagostomum* ve *Chabertia* gibi çeşitli nematodlar tarafından oluşturulan enfeksiyonlarda ortak olarak görülebilmektedir (82). Trichostrongilid nematod enfeksiyonlarının tanısı konvansiyonel olarak flotasyon (Mc Master), Baerrman tekniği veya larva kültürü gibi çeşitli tekniklerle dışkı örneklerinde nematod larva ve yumurtalarının belirlenmesi, sayımı ve identifikasyonları temeline dayanmaktadır (82). Bu konvansiyonel teşhis yöntemleri zaman alıcı olmakla birlikte, teşhis hatalarına da oldukça açıktır. Ayrıca tür identifikasyonları için larval kültür zorunlu olup bu proses tanı için gerekli

zamanı uzatmakta ve dolayısıyla etkili tedavi, müdahale ve kontrol süreci de gecikmektedir (159). Trichostrongilid nematod enfeksiyonlarının tanısında ayrıca antijen (coproantijen gibi) ve/veya antikor belirlemeye yönelik çeşitli immuno-serolojik teşhis yöntemleri de kullanılmıştır. Ancak özellikle konvansiyonel antikor tabanlı teknikler başta olmak üzere bu tanı testlerinin göstermiş olduğu düşük spesifite (çapraz reaksiyonlar) teşhisteki etkinliklerini sınırlamaktadır. Ayrıca serolojik testlerin, hastalığın erken veya latent dönemlerinde enfeksiyonu belirlemedeki duyarlılığı da düşük olup çoğunlukla risk faktörlerini belirleme amacıyla kullanım alanı bulmaktadırlar. Bu açıdan immuno-serolojik testler gastro-intestinal nematod enfeksiyonlarının teşhisinde sınırlı bir kullanım alanına sahip olmuştur (184). Trichostrongil tip nematod enfeksiyonlarının geleneksel yöntemler ile tanısında karşılaşılan söz konusu zorluklar nedeni ile günümüzde parazitin DNA veya RNA'sını belirlemeye yönelik moleküler tanı teknikleri önem kazanmıştır. Bu tekniklerin çeşitli patojenlerin teşhisinde kullanılmaya başlanması ile birlikte tanıdaki duyarlılık, güvenilirlik ve hız artmıştır (185-187). Son yıllarda geniş dinamik aralığı ile DNA'nın kantitatif olarak belirlenebilmesi amacıyla hızlı, kolay ve güvenilir bir yöntem geliştirilmiştir (121). Real-time PCR tekniği, hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle günümüzde patojenlerin teşhisinde öne çıkan tekniklerin başında gelmektedir. Real time PCR tekniği sahip olduğu yüksek duyarlılık ve özgünlük ile ruminantlarda çeşitli gastrointestinal nematod türlerinin spesifik ve kantitatif teşhisinde de kullanılmaya başlanmıştır (70, 183). Moleküler tanı teknikleri ve enfeksiyöz etkenlerinin filogenetik karakterizasyonu bu etkenlerin oluşturdukları enfeksiyonlarda potansiyel genetik ve çevresel risk faktörlerinin bir arada değerlendirilmesine olanak sağlamış olup aileler içinde ve popülasyonlar arasında hastalık etkenlerinin etiyolojisi ile dağılımlarını belirlemede ve hastalıktan korunma stratejilerinin geliştirilmesinde oldukça önemli bir zemin oluşturmuştur. Ayrıca moleküler epidemiyoloji, hastalık oluşum mekanizmalarında spesifik yolların, molekül ve genlerin belirlenmesi ile hastalıkların patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Günümüze kadar Trichostrongylid yumurtaların ayrımı için birçok PCR tabanlı moleküler teknik başarı ile kullanılmıştır (188-190). Real-time PCR tekniği tek bir uygulama ile hem identifikasyon hem de kantitasyona imkân sağlamaktadır.

Von Samson-Himmelstjerna ve ark. (83), ITS-2 gen bölgesinden dizayn edilen soy spesifik primer ve problarla 4 koyun trichostrongyid türüne ait 1. dönem larvaların saptanması,

identifikasyonu ve kantitasyonunda real time PCR tekniğinin etkinliğini araştırmışlardır. Araştırıcılar (83) söz konusu tekniğin soy bazlı özgünlüğünü yüksek belirlemelerine karşın, bu tekniğin dışkıdaki yumurtalarda etkinliğinin onaylanmaması ve multiplex formatta kullanılamamasıyla her örnek için 4 ayrı teste ihtiyaç göstermesi gibi faktörlerle kullanılabilirliğinin sınırlı olduğunu belirtmişlerdir. At strongylidleri ve trichostrongylidlerin antihelmentik dirençli suşlarının ayrımında da diğer bazı qPCR çalışmaları (144) yapılmış olup bu çalışmalar da larva ve/veya ergin DNA'sı ile sınırlı kalmıştır. Harmon ve ark. (191), son dönemde dışkıda uyguladıkları DNA ekstraksiyon tekniği ile PCR inhibitörlerinin azaltılmasına bağlı olarak tek bir *O. ostertagi* yumurtasından geleneksel jel-tabanlı PCR sisteminde başarılı ve duyarlı olarak enzimatik amplifikasyonun gerçekleştirildiğini rapor etmişlerdir. Takip eden dönem içerisinde Learmount ve ark. (183), İngiltere'de koyunlarda *Teladorsagia circumcincta* ve *H. contortus* teşhisinde, Andersen ve ark. (192) Danimarka'da strongil yumurtalarının belirlenmesinde, Höglund ve ark. (193) Almanya'da sığır dışkılarında *O. ostertagi* ve *C. oncophora* enfeksiyon düzeylerinin belirlenmesinde, Knight ve Bisset (194), Yeni Zellanda'da koyun dışkı kültürlerinden elde edilen strongylid larvaların identifiye edilmesinde ve Lecova ve ark. (195) Belçika'da sığırlarda *O. ostertagi*'ye ait referans genlerin belirlenmesinde real time PCR tekniklerini kullanmışlardır. Dünya'da *O. ostertagi* ve *H. contortus*'un moleküler identifikasyonu üzerine çalışmalar oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Türkiye'de ise günümüze kadar ruminantlarda Trichostrongylid nematodlar üzerine yapılmış moleküler tabanlı tek bir çalışma bulunmaktadır (196). Önder ve ark. (196) tarafından yapılmış çalışmada koyunlardan toplanmış dışkı örneklerinde TaqMan prob bazlı real time PCR tekniği ile *H. contortus*'un kantitatif moleküler teşhisi yapılmıştır. Çalışmamızda real time PCR'da *H. contortus* ve *O. ostertagi* türlerinin kantitatif identifikasyonları için mt-COI gen bölgesinden her iki tür için de dizayn edilen primerlerin tür spesifik olarak hedef DNA bölgesine bağlandığı belirlenmiştir. Dizayn edilen tüm final real time PCR markerlarının genetik analizlerle paralel şekilde spesifik olarak hedef türlerini amplifiye ettiği belirlenmiş, hedef dışı sığır Trichostrongylid türlerine ait mt-COI genomik DNA ve/veya plazmidleri ile reaksiyon vermedikleri saptanmıştır. Melting curve analizlerinde *O. ostertagi* ve *H. contortus* için erime sıcaklıkları spesifik olarak sırasıyla 80,0°C ve 75,0°C belirlenmiştir. *O. ostertagi* ve *H. contortus* türleri için linearize plazmidler kullanılarak oluşturulan standart eğri analiz sonuçlarına göre sybergreen real time PCR etkinlik oranları yüksek belirlenmiştir. Elde edilen verilerle her bir replikasyonda tüm türler için 10 hedef

kopyanın saptanabileceği belirlenmiştir. DNA kopya sayısındaki bu miktar sekiz haploid genom içeren tek bir yumurtaya karşılık gelmektedir. Trichostrongylid yumurtaları ile pozitif saptanan örneklere ait genomik DNA izolatlarının *O. ostertagi* ve *H. contortus* türleri yönünden sybergreen real time PCR ile analiz sonuçlarına göre Trichostrongylid yumurta pozitif 210 örneğin 34'ünde *O. ostertagi,* 58'inde *H. contortus* ve 23'ünde her iki türle miks enfeksiyon pozitifliği belirlenmiş ve incelenen toplam 920 sığır örneği bazında iki tür için moleküler prevalans oranları sırasıyla %6,2 ve %8,8 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda elde edilmiş bu moleküler prevalans sonucu Türkiye'de sığırlarda *O. ostertagi* ve *H. contortus* türleri için bir ilki temsil etmektedir. Çalışmamızda her iki tür için de tarafımızca dizayn edilen orijinal syber green real time PCR primerlerinin gerek Türkiye'de gerekse dünyada bu alanda yapılacak mlleküler tabanlı proje ve yayınlar için referans teşkil edeceği düşünülmektedir. Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz bu moleküler prevalans sonuçlarının Türkiye'de daha önce mikroskobi ve nekropsi sonuçlarına göre verilmiş prevalans sonuçlarının çoğuna göre düşük olması kullanılan moleküler yöntemin yüksek özgünlük ve duyarlılığa sahip olmasından kaynaklanabileceği kanaatine varılmıştır.

Birçok enfeksiyöz etkeninin evrimsel ve filogenetik ilişkilerinin araştırılmasında çeşitli nükler ribozomal ve mitokondrial gen bölgeleri hedef olarak kullanılmıştır. Ribozomal gen bölgeleri için 18S small subunit, 5.8S ve 28S gibi large subunit, ITS-1 ve ITS-2 gibi non fonksiyonel gen bölgeleri, external transcribed spacer (ETS); mitokondriyal gen bölgeleri için ise NAD4 ve COI gibi gen bölgeleri filogenetik ilişkilerin incelenmesinde tercih edilen gen bölgeleri olmuştur (70, 82). Mt-COI gen bölgesi, ökaryotlarda göstermiş olduğu intraspesifik polimorfizm ile nematod popülasyonlarındaki epidemiyolojik çalışmalarda, parazitlerin moleküler identifikasyonunda ve filogenetik analizlerinde yaygın olarak kullanılan mitokondrial gen bölgelerinin başında gelmektedir (197). Mt-COI gen bölgesi aynı zamanda DNA barkodlaması için de ideal bir gen bölgesidir. Yaşam barkodlaması (BOL), PCR sekanslaması ve "DNA barkodları" olarak bilinen ve mt-COI geninin 50 bölgesinden elde edilen kısa standart DNA sekanslarının analizini kullanarak tür identifikasyonlarını ve yeni türlerin keşfini kolaylaştıran global bir girişimdir. Her bir mitokondri kendine ait bir genoma sahiptir. Mt-DNA (MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3) analizleri evrimsel çalışmalarda kullanışlı bir moleküler markerdır (198). Nematodların mt-DNA'larının evrimi diğer parazit şubeleri ile karşılaştırıldığında son derece farklı olduğu görülmekte olup genellikle AT bazları bakımından zengindir. Nitekim çalışmamızda da analiz edilen yörsel izlatların mt-COI gen

bölgesinde *H. contortus* için ortalama AT oranı %65,8, *O. ostertagi* için ise %63,4 bulunmuştur.

Nematod mt-DNA'ları hızlı gelişmekte ve böylece genin yeniden düzenlenmesine ve rekombinasyonuna daha eğimli olmaktadır (199). Nematodların mitokondriyal genomları diğer metazoon gruplara göre daha küçüktür (~13,6-14,3 kb) (197). *H. contortus*'un mt-COI gen bölgesinin filogenetik analizi üzerine araştırmaların sınırlı olduğu ve GenBank veri tabanında sınırlı sayıda mevcut olduğu görülmüştür. Bu kayıtlarla ilgili çalışmalardan, Jex ve ark. (152) bir ergin erkek *H. contortus*'tan izole ettikleri total genomik DNA'nın long-PCR-coupled 454 sekanslama teknolojisiyle complete mt-genomunu (EU346694) belirlemişler ve bu mitokondrial genomun 14.055 bp uzunluğunda ve AT bakımından oldukça zengin (%78,1) olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırıcılar (152) *H. contortus* mitokondrial genomunun 36 gen içerdiğini, yapısının, büyüklüğünün ve gen düzenlemesinin Strongylidae üyeleri ile bazı farklılıklar göstermesine karşın çoğunlukla benzer özellikler gösterdiğini kaydetmişlerdir. Çalışmamızda filogenetik analizlerde hedef gen bölgelerinden biri olarak belirlediğimiz mt-COI gen bölgesinin ise ilgili çalışmada (152) toplam 1576 bp büyüklüğünde olduğu ortaya konmuştur. Diğer çalışmada ise, Sukhdeo ve ark. (200), Strongylida, Rhabditida ve Ascaridida takımında yer alan bazı nemotadların mt-COI gen bölgelerinin sekans ve filogenetik analizlerini gerçekleştirmişler ve gelişiminde doku göçü geçiren ve geçirmeyen ilgili takımlara ait türlerin ayrı filogenetik branşta yer aldığını belirlemişlerdir. Çalışmada (200) ayrı bir filogenetik branş oluşturan Trichostrongyloidea üst ailesinde *H. contortus* (HCU57033), *T. axei* ve *T. circumcincta* izolatları analiz edilmiş, *H. contortus* mt-COI gen bölgesine göre *T. axei'*ye daha yakın bulunmuştur. Brasil ve ark. (161) tarafından Brezilya'daki sığır, koyun, keçi ve bufalo gibi evcil ruminantlarda *H. contortus* ve *H. placei*'nin mt-COI gen bölgesine göre genetik farklılıklarını belirlemiş ve sığırlarda *H. contortus*'dan ziyade *H. placei*'nin daha yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada (161) haplotipik farklılığın her iki tür için de çok yüksek olduğu, *H. placei* için %0,97-98 (MG1Bos2011Hp, MG2Bos2011Hp) ve *H. contortus* için %0,98-1,00 (SP1Ovi2011Hc, MG2Ovi2011Hc, SC1Cap2011Hc, MG2Cap2011Hc, MG3Bub2011Hc). Ayrıca her iki tür için nükleotid farklılığının da yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Hussain ve ark. (201) tarafından Pakistan'da koyun, keçi ve sığırdan elde ettikleri *H. contortus* izolatlarının Mt-COI gen bölgesi sekanslarında (KJ724345-KJ724438) 152 polimorfik bölgenin tespit edildiği ve nükleotid farklılığının oldukça değişken olduğunu ve %0,036-22,77 arasında değiştiğini

bildirmişlerdir. Türkiye'de koyunlarda yapılan çalışmada (196) mt-COI gen bölgesi filogenetik analizlerine göre farklı soydaki trichostrongylid türlerine ait izolatlar arasında soy ve tür bazında intra ve interspesifik nükleotid varyasyonları belirlendiği, elde edilen sonuçlarla *H. contortus* Kayseri izolatlarının *Haemonchus* soyundaki GenBank'ta mevcut diğer iki izolatla birlikte aynı filogenetik branşta yer aldığını bildirilmiştir. Aynı çalışmada (196) TrERUHcon01, TrERUHcon02 ve TrERUHcon03 *H. contortus* izolatlarının %96,3-%100,0 identik oldukları ayrıca Amerika (HCU57033) ve Avustralya (EU346694)'da koyunlardan izole edilmiş izolatlarla da ortalama %5,3±0,6 genetik farklılık gösterdikleri rapor edilmiştir. *Ostertagia ostertagi* için ise mt-coi gen bölgesine göre dünyada Genbank kaydı yapılan izolat sayısı çok az olup bir tanesinin Zarlenga ve ark. (202) tarafından A.B.D'den girildiği (AF04494) diğerlerinin tamamının ise Japonya'dan aynı bilim insanları (Mochizuki ve Fukumoto) tarafından girildiği görülmüştür. Türkiye'de ise bu konuda yapılmış moleküler bir çalışma ve bir Genbank kaydı bulunmamaktadır. Zarlenga ve ark. (202), Amerika Birleşik Devletleri'nde yaptıkları çalışmada mt-coi gen bölgesine göre *O. ostertagi* için 393 bp'lik bir bölge üzerinde 33 polimorfik ve 28 sinonim bölge olduğunu rapor etmişlerdir. Lv ve ark. (203) Çin'de yapılan çalışmada mt-coi gen bölgesinin Ostertagiinae alt ailesinde *Teladorsagia, Ostertagia* ve *Marshallagia* soylarındaki türlerin ayrımında kullanışlı olduğu ve bu gen bölgesinin bu türlerin DNA barkodlamasında kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda ise *O. ostertagia* ve *H. contortus* türlerine ait mt-COI gen bölgesinin 402 bp kısmını içeren toplam 14 sekans başarıyla elde edilmiştir. *O. ostertagi* izolatlarına (TrOost-1-TrOost-5) ait sekanslar arasında 391 (%97,3) identik bölge belirlenirken 4 farklı haplotipi ortaya koyan 11 polimorfik bölge saptanmıştır. *H. contortus* izolatlarına (TrHcon-1TrHcon-9) ait sekanslar arasında ise 398 (%99,0) identik bölge saptanmış, 6 farklı haplotipi ortaya koyan 4 polimorfik bölge görülmüştür. Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılan *O. ostertagia ve H. contortus* izolatları arasında farklı haplotipleri ortaya koyan interspesifik ve intraspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Sekanslanan *O. ostertagi* izolatları arasında ortalama pairwise identiklik oranı %98,5 belirlenmiş bu oran *H. contortus* izolatları için ise %99,6 olarak saptanmıştır. Bayesian filogenisine göre oluşturulan filogenetik çözünürlük yüksek posterior olasılıklarla desteklenmiştir. Çalışmada karakterize edilen *O. ostertagia* ve *H. contortus* haplotipleri arasında arasında ortalama genetik heterojenite sırasıya %3,0±0,6 ve %3,1±0,6 saptanmıştır. Çalışmada karakterize edilen *H.*

contortus izolatları filogenetik ağaç üzerinde görüleceği üzere Kayseri yöresinde koyunlardan izole edilen izolatlarla daha yakın bulunmuş (genetik farklılık %1,1±0,5) ve birlikte cluster oluşturmuştur. Karakterize edilen bu izolatlar ayrıca Pakistan ve Brezilya'dan bildirilen izolatlarla sırasıyla %3,4±1,0 ve %5,7±1,1 farklılık göstermiştir. Türkiye'den ilk kez izole ve karakterize ettiğimiz *O. ostertagia* izolatları ayrı bir grup oluşturmuş ve bu grup içinde iki cluster'da yerleşim göstermiştir. Çalışmada belirlenen bu izolatlar ayrıca GenBank'ta yalnızca Japonya'dan mevcut olan homolog izolatlarla %4,3±0,9 genetik farklılık göstermiştir. Çalışmada saptanan izolatların soy bazında genetik analizlerinde *H. contortus* izolatlarının %17,1±2,6, %18,3±2,6, %18,7±2,8, %20,7±3,0, %22,0±3,3 ve %24,6±3,6 genetik farklılıklarla sırasıyla *Cooperia oncophora, Mecistocirrus digitatus, Trichostrongylus axei, O. ostertagi, Teladorsagia circumcincta* ve *Nematodirus spathiger* türlerine filogenetik olarak yakın olduğu belirlenmiştir. *O. ostertagia* izolatlarının ise %15,2±2,3, %15,8±2,4, %16,3±2,6, %17,3±2,6, %19,8±3,0 ve %20,7±3,0 genetik farklılıklarla sırasıyla *T. circumcincta, Tr. axei, C. oncophora, N. spathiger, M. digitatus* ve *H. contortus* türlerine filogenetik olarak yakın olduğu saptanmıştır

Geçmişten günümüze gastrointestinal nematod enfeksiyonların kontrolünde en yaygın mücadele şekli uygun ve etkin antihelmentik kullanımı olmuştur. Bu amaçla çeşitli kimyasal gruplara dahil birçok antihelmentik etkinlik açısından araştırılmış ve kullanıma sunulmuştur. Ancak bu ilaçların sürekli ve bilinçsiz kullanımı sonucu birçok etken maddeye karşı parazitlerde direnç gelişimi ortaya çıkmış ve neticesinde günümüzde çeşitli antihelmentik gruplarının etkinliği azalmış ve zamanla ekonomik kayıpların artmasına neden olmuştur (204-207). Trichostrongylid nematodlarının ruminantlarda tedavi ve mücadelesinde en sık kullanılan kimyasal etken maddelerinden birisi de benzimidazol grubu anthelmentiklerdir. Benzimidazoller, mikrotubul dinamiklerini inhibe ederler ve parazitik helmintlerde dirençliliğin sebebi olarak bilinen β-tubulin geninde nokta mutasyonlarına neden olurlar (119). Günümüze kadar yapılan moleküler çalışmalar β-tubulin izotip 1 genindeki 167, 198 ve 200. kodonlarda olmak üzere üç tek nükleotid polimorfizminin (SNPs) çeşitli nematod gruplarında benzimidazol dirençliliği ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (208, 209). *H. contortus* için, β-tubulin isotype 1 geninin 200. kodonunda Phe/Phe (TTC/TTC) (homozygous), ve 167 ve 198. kodonlarda sırasıyla Phe/Phe [TTC/TTC] ve Glu/Glu [GAA/GAA] (wild-type) bulunduran parazitlerin benzimidazollere duyarlı olduğu kaydedilmektedir. Bunun aksine ilgili gen bölgesinde tek nokta polimorfizmi ile 200. ve 167.

kodonlarda Tyr/Tyr (TAC/TAC), 198. kodonda ise Ala/Ala (GCA/GCA) bulunduran parazit nesillerinin ise benzimidazollere dirençli olduğu ortaya konmuştur (119, 149, 209). *H. contortus* nesillerinde bu polimorfizmlerden en az birini barındıran nesiller benzimidazol dirençli olarak klasifiye edilmektedir. *H. contortus* ergin, larva ve yumurta dönemlerinde bireysel veya havuzlar oluşturularak β-tubulin izotip 1 genindeki tek nükleotid polimorfizmlerine göre çeşitli moleküler dirençlilik çalışmaları (121, 146) yapılmış olup bu çalışmalar moleküler tanı tekniklerinin dirençlilik saptanmasında kullanılan konvansiyonel Dışkı Yumurta Sayısı Azalım (FECRT) ve Larval Gelişim Testlerine (LDA) göre çok daha yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Son yıllarda *H. contortus* popülasyonlarında benzimidazol dirençliliğinin yüksek sensitivite ve spesifitede kantitatif analizine ve dolayısıyla allel sıklığının ölçümüne imkan sağlayan real time PCR teknolojisi ile sınırlı sayıda çalışmaların (121, 144, 166, 168) yapıldığı görülmektedir. Alvarez-Sánchez ve ark. (144), *H. contortus* popülasyonlarında larvalardan elde edilmiş genomik DNA havuzlarında, benzimidazol dirençliliğini β-tubulin izotip 1 geninde 200. kodonaki SNPs'yi hedef alarak Sybergreen tabanlı qPCR ile araştırmışlar, duyarlı popülasyonlarda duyarlı allel sıklığını %76,0, dirençli allel sıklığını %24,0 belirlerken, dirençli popülasyonlarda duyarlı allel sıklığını %28,7, dirençli allel sıklığını ise %71,3 saptamışlardır. Araştırıcılar (144), ayrıca hem duyarlı hem de dirençli popülasyonlar için real time PCR, FECRT ve LDA testlerinin sonuçları arasında iyi bir uyum olduğunu bildirmişlerdir. Walsh ve ark. (166), *H. contortus* 3. dönem larvalarında benzimidazol dirençliliğini ve dirençli allel sıklığını locked nucleic acid (LNA) Taqman probları kullanarak real time PCR'da araştırmışlar ve bu teknikle dirençli allel sıklığının ≥ %10 olan popülasyonlarda yüksek sensitivite ile belirlenebileceğini kaydetmişlerdir. von Samson-Himmelstjerna ve ark. (121), *H. contortus* popülasyonlarında benzimidazol dirençli allel sıklığını 3. dönem larvalarda 200. kodondaki TTC/TAC polimorfizmini hedef alarak real time PCR ve pyrosequencing teknolojisi ile araştırmışlar ve her iki tekniğin birbiri ile yüksek uyum gösterdiğini, konvansiyonel dirençlilik testlerinden çok daha duyarlı ve özgül olduklarını belirlemişlerdir. dos Santos ve ark. (168), Brezilya'nın kuzey doğusunda koyunlardan izole ettikleri benzimidazol duyarlı ve dirençli ergin erkek *H. contortus*'lardan oluşan toplam 7 genomik DNA havuzunda benzimidazol dirençliliğini β-tubulin izotip 1 geninde 200. kodonaki SNPs'yi hedef alarak Sybergreen tabanlı qPCR ile araştırmışlar, duyarlı ve dirençli allel sıklığını sırasıyla %63,58-%98,24 ve % 1,76-%36,42 arasında belirlemişlerdir. Çalışmamızda araştırma merkezlerindeki *H. contortus* pozitif

belirlenen örneklerde benzimidazol dirençliliğinin araştırılmasında, Walsh ve ark. (166) tarafından bildirilen primerler ve prob standardizasyon aşamalarında etkin bulunmuş ve örneklerin analizinde kullanılmıştır. Çalışmamızda araştırma merkezlerinde *H. contortus* pozitif belirlenen sığırlarda β tubulin izotip-1 gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmine göre benzimidazol dirençliliği açısandan duyarlı allel sıklığı duyarlı allel sıklığı %80,00±1,99 belirlenirken dirençli allel sıklığı ise %20,00±1,99 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçların dos Santos ve ark.'nın (168) bulgularıyla paralellik gösterdiği görülmüştür. Ct (dR) değerlerine göre belirlenen duyarlı ve dirençli allel sıklıklarının istatistiksel analizine göre duyarlı alell sıklığının dirençli allel sıklığına oranla yaklaşık 4 kat yüksek olduğu belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,001$).

Çalışmamızda duyarlı ve dirençli allel sıklıklarına göre belirlenen bazı izolatlarda β tubulin izotip-1 gen bölgesinin sekansları ortaya konmuş ve benzimidazol dirençliliği açısından SNPs araştırılmıştır. Sekans analizleriyle β tubulin izotip-1 gen bölgesi yönünden Real Time PCR analizlerinde allel sıklığı %100 belirlenen 10 izolatın tümü ile dirençli allel sıklığı >50 saptanan 8 izolattan 5'inde aminoasit dizisinde 167., 200. ve 198. (115, 117, 119, 209) kodonlarında benzimidazol duyarlı nesillerdeki sırasıyla fenilalanin (TTC), fenilalanin (TTC) ve glutamin (GAA) amino asitleri belirlenmiştir. Dirençli allel sıklığı >50 belirlenen ve sekans analizleri gerçekleştirilen 8 izolattan kalan diğer 3'ünün ise 200. kodonda tek nükleotid polimorfizmi gösterdiği ve fenilalanin (TTC) amino asidinin tirozin amino asitine (TAC) dönüştüğü saptanmıştır. İlgili üç izolatın 167. ve 198. kodonlarında ise polimorfizm belirlenmemiştir. Nitekim yapılan çalışmalar *H. contortus* ve diğer bazı trichostrongylid nemotadlarda benzimidazol dirençliliği ile ilgili olarak en yaygın SNPs'in 200. kodondaki fenilalanin–tirozin polimorfizmi olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçların ilgili çalışmaların (115, 117, 119, 209) sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüş, *H. contortus* dirençli allellere ait izolatların β tubulin izotip-1 gen bölgesinde tek nükleotid polimorfizmi yalnızca 200. kodonda belirlenmiş, 167. ve 198. kodonlarında ise polimorfizm olmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez sığırlarda *O. ostertagi* ve *H. contortus* üzerine morfolojik ve moleküler analizler bir arada kullanılarak karakterizasyon ve filogeni çalışması yapılmış, moleküler epidemiyolojik veriler elde edilmiştir. Bu sonuçlarla Kayseri yöresinde *O. ostertagi* ve *H. contortus*'un moleküler prevalansı uygulanan real time PCR tekniği ile kantitatif olarak ortaya konmuş olup bu tekniğin sahip olduğu yüksek duyarlılık ve

özgünlükle sığırlarda *O. ostertagi* ve *H. contortus* enfeksiyonlarında tedavi ve kontrol stratejilerinin oluşturulmasında kullanılmasıyla etkin sonuçlar elde edileceği belirlenmiştir. Çalışmada real time PCR analizleri ile *O. ostertagi* ve *H. contortus* pozitif belirlenen örneklere ait izolatların moleküler identifikasyon ve filogenetik çalışmalarda sıklıkla kullanılan mitokondrial cytochrome oxidase subunit 1 gen bölgeleri Türkiye'de sığırlarda ilk kez genetik olarak karakterize edilmiş ve yöresel izolatların filogenetik analizleri gerçekleştirilerek GenBank kayıtları sağlanmıştır. Çalışma ile mt-coi gen bölgesini parsiyal olarak amplifiye eden orijinal primer dizaynı yapılmış, GenBank veri tabanında yapılan analizlerle ve sekans analizleriyle yüksek spesifite gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda çalışma ile yine *H. contortus* popülasyonlarında benzimidazol dirençliliği moleküler olarak β-tubulin izotip 1 genindeki tek nükleotid polimorfizmi'ni hedef alan kantitatif TaqMan prob bazlı real time PCR yöntemi ile araştırılmış, sığırlarda duyarlı ve dirençli allel sıklıkları belirlenerek risk faktörleri ortaya konmuştur. Duyarlı ve dirençli allellere sahip izolatların klonlama ve plasmid pürifikasyonu sonrası ilgili gen bölgesi yönünden sekans analizleri gerçekleştirilerek konfirmasyonları sağlanmış, dirençli allele sahip izolatlarda SNPs belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar araştırma yöresinde dirençli popülasyonların varlığını ortaya koymuş olup, popülasyon dinamikleri açısından tedavi ve ilaçlama yöntemlerinin gözden geçirilmesi ve alternatif stratejilerin oluşturulmasının zorunlu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Nitekim Türkiye'de trichostrongylid enfeksiyonlarına karşı ruminantlarda benzimidazoller ve türevleri ile diğer bazı gruplardaki anthelmentikler gelişigüzel kullanılmakta olup bu durum dirençli popülasyon oluşumunda oldukça büyük bir risk oluşturmaktadır. Bu açıdan ülke çapında geniş kapsamlı ve özellikle yüksek duyarlılıktaki moleküler tekniklerle dirençlilik analiz çalışmalarına ihtiyaç olduğu görülmektedir. Söz konusu çalışma, Türkiye'de trichostrongylid enfeksiyonlarına yol açan türlerin moleküler identifikasyon ve filogenetik karakterizasyonlarının yanısıra ilaç dirençliliğinin moleküler düzeyde belirlenmesi üzerine yapılacak ileriki çalışmalara model olma niteliğindedir.

6. KAYNAKLAR

1. Soulsby EJL. Text book of Veterinary Clinical Parasitology. Volume I: Helminths. Blackwell Scientific Publications. F. A. Davis Company. Oxford, UK, 1965.

2. Snider TG, Ochoa R, Williams JC. Animal model of human disease: Menetrier's Disease Pre-Type II and Type II Ostertagiosis in Cattle. Am J Pathol 1983; 113(3): 410-412.

3. Taxonomicon. Evrensel Taksonomik Hizmetleri. http:// taxonomicon. taxonomy.nl Erişim tarihi: 02.04.2017.

4. Mönnig HO. Veterinary helminthology and entomology.3. ed. The Williams & Wilkins company, Baltimore, 1950.

5. Güralp, N. Anadolu sığırlarının abomasus'larında görülen Trichostrongylidae türleri ve bunların koyunlarımızda görülen nevilerle mukayesesi. Ank Üniv Vet Fak Derg 1958; 5: 177-185.

6. Ergün H. Geviş getiren hakanlarımızda görülen Gastro-İntestinal nematodlar. Etlik Vet Mikrob Derg 1968; 2 (1): 33-39.

7. Celep A, Gürsoy S. Türkiye'de sığırlarda Ostertagia lyrata (Sjoberg, 1906) (İlk Rapor). Etlik Vet Mikrob Derg 1989; 6 (5): 95-98.

8. Günay M. Marmara bölgesi sığırlarının gastro-intestinal nematodları. Doğa Tr J of Vet Anim Sci 1992; 16: 441-445.

9. Tiğin Y, Burgu A, Doğanay A, Öğe H, Öğe S. İç Anadolu Bölgesi 'nde sığır mide-barsak nematodları ve mevsim içi aktiviteleri. Doğa Tr J of Vet Anim Sc 1993; 17: 341-349.

10. Ergül R. Bursa ili sığırlarında Gastro-intestinal sistem nematodlarının yayılışı. Hay Araş Derg 1996; 6 (1-2): 8-14.

11. Umur Ş. Kars yöresi sığırlarının mide barsak nematodları ve mevsimsel dağılımları. Tr J Vet Anim Sci 1996; 20: 307-313.

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

13. Yıldırım A, Kozan E, Kara M, Öge H. Kayseri bölgesinde kapalı sistemde yetiştirilen sığırlarda helmint enfeksiyonlarının durumu. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2000; 47: 333-337.

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

15. Köroğlu E, Şimşek S, Dilgin N, Gültekin İ, Altaş MG. Elazığ yöresi sığırlarında sindirim sistemi nematodlarının yaygınlığı. Fırat Üniv Sağ Bil Derg 2001; 15: 155-164.

16. El-Moukdad AR. Helminth fauna of Syrian cattle. Angew Parasitol 1979; 20 (1): 11-16.

17. Fukumoto S, Etani K, Toi K, et al. Epidemiology of abomasal nematodes of dairy cattle in Hokkaido,northern Japan. Nippon Juigaku Zasshi 1990; 52 (2): 379-385.

18. Bairden K, Armour J. A survey of abomasal parasitism in dairy and beef cowsin south-west Scotland. Vet Rec 1981; 109: 153-155.

19. Bejsovec J, Donat K. Internal parasites in calves and heifers in acentralrearing barn. Vet Med (Praha) 1982; 27 (7): 405-417.

20. Vercruysse J, Dorny P, Berghen P, Geeraerts J. Abomasal parasitism indairy cows in Belgium. Vet Parasitol 1986; 22: 285-291.

21. Agneessens J, Claerebout E, Domy P, Borgsteede FHM, Vercruysse J. Nematode parasitism in adult dairy cows in Belgium. Vet Parasitol 2000; 90: 83-92.

22. Borgsteede FHM, Tibben J, Cornelissen JBWJ, Agneessens J, Gaansenbeek CPH. Nematode parasites of adult dairy cattle in the Netherlands. Vet Parasitol 2000; 89: 287-296.

23. Almeria S, Llorente MM, Uriarte J. Monthly fluctuations of worm burdens Andhypobiosis of gastrointestinal nematodes of calves in extensive management systems in the Pyrenees (Spain). Vet Parasitol 1996; 67: 225-236.

24. Randall RW, Gibbs HC. Occurence and seasonal behavior of gastrointestinal nematodes infecting Maine dairy cattle. Am J Vet Res 1977; 38 (10): 1665-1668.

25. Charles TP, Baker NF. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematodes of beef calves grazed on irrigated pastures in the lower Sacramento. Am J Vet Res 1988; 49(4): 506-511.

26. Malczewski A, Jolley WR, Woodard LF. Prevalence and epidemiology of trichostrongylids in Wyoming cattle with consideration of the inhibited development of Ostertagia ostertagi. Vet Parasitol 1996; 64: 285-297.

27. Marnu W, Wintersteller E, Prosl H. Monthly and seasonal fluctuations in abomasal nematode worm burden of naturally infected cattle in Austria. Vet Parasitol 1987; 23: 237-248.

28. Purewal A, Fox MT, Shivalkar P, et al. Effects of Ostertagia ostertagi on gastrin gene expression and gastrin-related responses in the calf. J Physiol 1997; 498(3): 809-816.

29. Gasbarre LC, Leighton EA, Sonstegard T. Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. Vet Parasitol 2001; 98: 51-64.

30. Mansour MM, Dixon JB, Rowan TG, Carter SD. Modulation of calf immune responses by Ostertagia ostertagi: The effect of diet during trickle infection. Vet Immunol Immunop 1992; 33(3): 261-269.

31. Vercruysse J, Claerebout E. Immunity development against Ostertagia ostertagi and other gastrointestinal nematodes in cattle. Vet Parasitol 1997; 72: 309-326.

32. Rinaldi M, Dreesen L, Hoorens PR, et al. Infection with the gastrointestinal nematode Ostertagia ostertagi in cattle affects mucus biosynthesis in the abomasum. Vet Res 2011; 42(1): 61.

33. Armour J. Parasitic gastroenteritis in cattle. Vet Rec 1974; 95: 391-395.

34. Charlier J, Der Voort MV, Hogeveen H, Vercruysse J. ParaCalc®-A novel tool to evaluate the economic importance of worm infections on the dairy farm. Vet Parasitol 2012; 184(2-4): 204-211.

35. Iqbal Z, Jabbar A. Dealing with a threat, http://www.dawn.com/ weekly/science/archive/050416/science4.html (18.04.2012).

36. Bachaya HA, Iqbal Z, Jabbar A, et al. Copping with loss of livestock, http://www.dawn.com/2006/02/26/eber5.html (15.03.2012).

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

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

39. Mortensen LL, Williamson LH, Terrill TH, et al. Evaluation of prevalence and clinical implications of anthelmintic resistance in gastro-intestinal nematodes of goats. JAVMA 2003; 23: 495-500.

40. Toparlak M, Tüzer E. Veteriner Helmintoloji. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları 2000, s. 90-94.

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

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

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

44. Umur Ş. Türkiye'de gevişenlerde görülen Trichostrongylina türleri ve tanı sorunları. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kongre özet kitabı, 2011, Kars. s. 40-45.

45. Lima WS. Seasonal infection pattern of gastrointestinal nematodes of beef cattle in Minas Gerais State-Brazil. Vet parasitol 1998; 74 (2-4): 203-214.

46. Kaufmann J, Pfıster K. The seasonal epidemiology of gastrointestinal nematodes in N'Dama Cattle in the Gambia. Vet Parasitol 1990; 37: 45-54.

47. Achi YL, Zinsstag J, Yéo N, Dea V, Dorchies PH. Les nématodes gastro-intestinaux des bovinsde la région des savanes de la Côte-d'Ivoire: Enquête d'abattoir. Revue Méd Vét 2003; 154 (2): 105-112.

48. Iqbal MU, Sajid MS, Hussain A, Khan MK. Prevalence of helminth infections in dairy animals of Nestle milk collection areas of Punjab (Pakistan). VIII World Buffalo congress. Ital J Anim Sci 2007; 6: 935-938.

49. Santos TR, Lopes WDZ, Buzulini C, et al. Helminth fauna of bovines from the Central-Western region, Minas Gerais State, Brazil. Cienc Rural 2010; 40: 934-938.

50. Waruiru RM, Nansen P, Kyvsgaard NC, et al. An abattoir survey of gastrointestinal nematode infections in cattle in the central highlands of Kenya. Veterinary Research Communications 1998; 22: 325-334.

51. Geldhof P, Knox D. The intestinal contortin structure in Haemonchus contortus: An immobilised anticoagulant. Int J Parasitol 2008; 38(13): 1579-1588.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

73. Mes TH, Eysker M, Ploeger HW. A simple, robust and semi-automated parasite egg isolation protocol. Nat Protoc 2007; 2: 486-489.

74. Gibbs HC. Hypobiosis in parasitic nematodes-an update. Adv Parasitol 1986; 25: 129-174.

75. Sommer C. Digital image analysis and identification of eggs from bovine parasitic nematodes. J Helminthol 1996; 70: 143-151.

76. Sommer C. Quantitative characterization of texture used for identification of eggs of bovine parasitic nematodes. J Helminthol 1998; 72: 179-182.

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

78. Dobson RJ, Barnes EH, Birclijin SD, Gill JH. The survival of Ostertagia circumcincta and Trichostrongylus colubriformis in faecal culture as a source of bias in apportioning egg counts to worm species. Int J Parasitol 1992; 22: 1005-1008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

96. Friedman PA, Platzer EG. Interaction of anthelmintic benzimidazoles and benzimidazole derivatives with bovine brain tubulin. Biochim Biophys Acta 1978; 544:605-614.

97. Köhler P, Bachmann R. Intestinal tubulin as possible target for chemotherapeutic action of mebendazole in parasitic nematodes. Mol Biochem Parasitol 1981;4: 325-336.

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

99. Sackett DL, Varma JK. Molecular mechanism of colchicine action: Induced local unfolding of beta-tubulin. Biochemistry 1993; 32: 13560-13565.

100. Uppuluri S, Knipling L, Sackett DL, Wolff J. Localization of the colchicine-binding site of tubulin. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 11598-11602.

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

102. Nare B, Lubega G, Prichard RK, Georges E. p-Azidosalicyl-5- amino-6-phenoxybenzimidazole photolabels the N-terminal 63-103 amino acids of Haemonchus contortus b-tubulin. J Biol Chem 1996; 271:8575-8581.

103. Hollomon DW, Butters JA, Barker H, Hall L. Fungal betatubulin, expressed as a fusion protein, binds benzimidazole and phenylcarbamate fungicides. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2171-2173.

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

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

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

107. Paiement JP, Leger C, Ribeiro P, Prichard RK. Haemonchus contortus: Effects of glutamate, ivermectin, and moxidectin on inulin uptake activity in unselected and ivermectin-selected adults. Exp Parasitol 1999; 92: 193-198.

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

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

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

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

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

113. Kerboeuf D, Blackhall W, Kaminsky R, von Samson-Himmelstjerna G. P-glycoprotein in helminths: Function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. Int J Antimic 2003; 22: 332-346.

114. Kwa MS, Veenstra JG, Van Dijk MV, Roos MH. β-tubulin genes from the parasitic nematode Haemonchus contortus modulate drug resistance in Caenorhabditis elegans. J Mol Biol 1995; 246:500-510.

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

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

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

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

119. Ghisi M, Kaminsky R, Maser P. Phenotyping and genotyping of Haemonchus contortus isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematode. Vet Parasitol 2007; 144:313-320.

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

121. von Samson-Himmelstjerna G, Walsh TK, Donnan AA, et al. Molecular detection of benzimidazole resistance in Haemonchus contortus using real-time PCR and pyrosequencing. Parasitology 2009; 136:349-358.

122. Elard L, Comes AM, Humbert JF. Sequences of beta-tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and -resistant strains of Teladorsagia circumcincta, a nematode parasite of small ruminants. Mol Biochem Parasitol 1996; 79: 249-253.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

141. Lacey E, Prichard RK. Interactions of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of Haemonchus contortus. Mol Biochem Parasitol 1986; 19:171-181.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

157. Duszynski DW, Wilber PG. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. J Parasitol 1997; 83: 333-336.

158. Velkers FC, Blake DP, Graat EA, et al. Quantification of Eimeria acervulina in faeces of broilers: comparison of McMaster oocyst counts from 24h faecal collections and single droppings to real-time PCR from cloacal swabs. Vet Parasitol 2010;169: 1-7.

159. van Wyk JA, Mayhew E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. Onderstepoort J Vet Res 2013;80(1):539.

160. Lalonde LF, Gajadhar AA. Highly sensitive and specific PCR assay for reliable detection of Cyclospora cayetanensis oocysts. Appl Environ Microbiol 2008; 74: 4354-4358.

161. Brasil BS, Nunes RL, Bastianetto E, et al. Genetic diversity patterns of Haemonchus placei and Haemonchus contortus populations isolated from domestic ruminants in Brazil. Int J Parasitol 2012; 42(5):469-479.

162. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 2012; 28, 1647-1649.

163. Vrba V, Blake DP, Poplstein M. Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven Eimeria species that infect the chicken. Vet Parasitol 2010; 174: 183-190.

164. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature methods. 2012;9(8):772.

165. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 2001;17(8):754-755.

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

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

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

169. Aypak S. Mide Bağırsak Nematodları. Turkiye Klinikleri J Vet Sci 2012; 3(2): 97-102.

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

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

172. Merdivenci A. Türkiye Parazitleri ve Parazitolojik Yayınları, İst Ünv Cerrahpaşa Tıp Fak yayınları Rektörlük No: 1610, Dekanlık No: 9, İstanbul, 1970.

173. Güralp N. Helmintoloji, Ank Ünv Vet Fak Yay No: 368 Ders Kitabı :266, İkincibaskı, Ank Ünv Basımevi, Ankara, 1981.

174. Anene BM, Onyekwodiri EO, Chime AB, Anika SM. A survey of gastrointestinal parasites in cattle of southeastern Nigeria. Preventive Veterinary Medicine 1994; 20:297-306.

175. Waruiru RM, Kyvsgaard NC, Thamsborg SM, et al. Prevalence and intensity of helminth and coccidial infections in dairy cattle in Central Kenya. Veterinary Research Communications 2000; 24:39-53.

176. Regassa F, Sori T, Dhuguma R, Kiros Y. Epidemiology of gastrointestinal parasites of ruminants inWestern Oromia, Ethiopia. Int J Appl Res Vet Med 2006; 4(1):51-57.

177. Awraris T, Bogale B, Chanie M. Occurrence of gastro intestinal nematodes of cattle in and around Gondar town, Amhara regional state, Ethiopia. Acta Parasitol Glob 2012; 3(2): 28-33.

178. Bilal MQ, Hameed A, Ahmad T. Prevalenceof gastrointestinal parasites in buffalo and cow calves inrural areas of Toba Tek Singh, Pakistan. J Anim Plant Sci 2009; 19(2): 67-70.

179. Maichomo MW, Kagira JM, Wkeral T. The point prevalence of gastro-intestinal parasites in calves, sheep and goats in Magadi division, south-western Kenya. Onderstepoort Journal of Preventive Veterinary Medicine 2004; (20): 297-306.

180. Marskole P, Verma Y, Dixit AK, Swamy M. Prevalence and burden of gastrointestinal parasites in cattle and buffaloes in Jabalpur, India. Vet World 2016; 9(11):1214-1217.

181. Fikru R, Teshale S, Reta D, Yosef K. Epidemiology of gastro intestinal parasites of ruminantsin Western Oromia Ethiopia. Int J Appl Res Vet Med 2006; 4: 51-57.

182. Hansen J, Perry B. The epidemiology, diagnosis and control of gastro intestinal parasites of ruminants in Africa. English Pres Ltd, Nairobi 1990.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

192. Andersen UV, Haakansson IT, Roust T, et al.Developmental stage of strongyle eggs affects the outcome variations of real-time PCR analysis. Vet Parasitol 2013; 16;191(1-2):191-196.

193. Höglund J, Engström A, von Samson-Himmelstjerna G, Demeler J, Tydén E. Real-time PCR detection for quantification of infection levels with Ostertagia ostertagi and Cooperia oncophora in cattle faeces. Vet Parasitol 2013;197(1-2):251-257.

194. Knight JS, Bisset SA. Real-time PCR/DNA melting curve-based assay to identify individual strongylid larvae recovered from ovine faecal cultures. Vet Parasitol 2015; 214(3-4):337-341.

195. Lecová L, Růžičková M, Laing R, et al. Reliable reference gene selection for quantitative real time PCR in Haemonchus contortus. Mol Biochem Parasitol 2015; 201(2):123-127.

196. Önder Z, Yildirim A, İnci A, Düzlü Ö, Çiloğlu A. Molecular prevalence, phylogenetic characterization and benzimidazole resistance of Haemonchus contortus from sheep. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2016; 22 (1): 93-99.

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

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

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

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

201. Hussain T, Periasamy K, Nadeem A, et al. Sympatric species distribution, genetic diversity and population structure of Haemonchus isolates from domestic ruminants in Pakistan. Vet Parasitol 2014; 206(3-4):188-199.

202. Zarlenga DS, Stringfellow F, Nobary M, Lichtenfels JR. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from three species of Haemonchus (Nematoda:

Trichostrongyloidea) and identification of PCR primers for rapid differentiation. Exp Parasitol 1994;78(1): 28-36.

203. Lv J, Zhang Y, Feng C, et al. Species discrimination in the subfamily Ostertagiinae of Northern China: Assessment of DNA barcode in a taxonomically challenging group. Parasitol Res 2016;115(3):987-996.

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

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

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

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

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

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