

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

**BURSA KARACABEY YÖRESİNDE ATLARDA
THEILERIA EQUI VE *BABESIA CABALLI*'NİN REAL
TIME PCR İLE ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan
Fatih KIZILASLAN**

**Danışman
Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM**

Doktora Tezi

**Kasım 2012
KAYSERİ**

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

**BURSA KARACABEY YÖRESİNDE ATLARDA
THEILERIA EQUI VE *BABESIA CABALLI*'NİN REAL
TIME PCR İLE ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan
Fatih KIZILASLAN**

**Danışman
Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM**

Doktora Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSD-10-2876 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Kasım 2012
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: Fatih KIZILASLAN

İmza : 

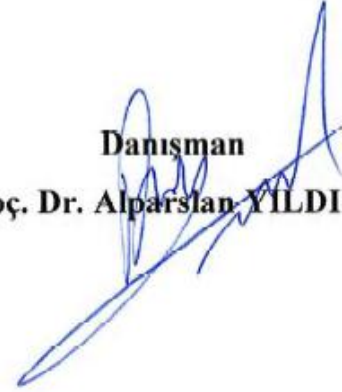
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Bursa Karacabey Yöresinde Atlarda *Theileria equi* ve *Babesia caballi*’nin Real Time PCR ile Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu”, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

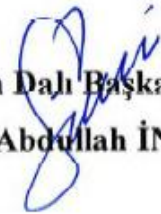
Tezi Hazırlayan
Fatih KIZILASLAN



Danışman
Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM



Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Abdullah İNCİ



Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM danışmanlığında **Fatih KIZILASLAN** tarafından hazırlanan “**Bursa Karacabey Yöresinde Atlarda *Theileria equi* ve *Babesia caballi*’nin Real Time PCR ile Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Parazitoloji** Anabilim Dalı’nda **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

22/11/2012

JÜRİ :

İmza

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



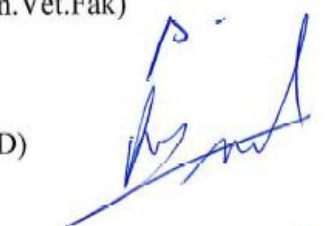
Üye : Prof. Dr. Süleyman YAZAR (Tıp Fak.Parazitoloji AD)



Üye : Prof. Dr. Bayram Ali YUKARI (Mehmet Akif Ersoy Ün.Vet.Fak)



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



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



ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 22/11/2012...tarih ve...563...sayılı kararı ile onaylanmıştır.

22.11.2012

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her aşamasında beni cesaretlendiren, bilgi, beceri ve tecrübesinden faydalandığım, eleştirileri ve yardımları ile her zaman yol gösterici olan, çalışma disiplini, işine gösterdiği hassasiyet ile örnek aldığım hocam ve tez danışmanım sayın Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM başta olmak üzere, saha ve laboratuvar çalışmalarım esnasında her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdullah İNCİ ve diğer öğretim elemanları Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ, Öğretim Görevlisi Zuhale BİŞKİN ve Araştırma Görevlisi Arif ÇİLOĞLU'na, ve son olarak da aileme desteklerinden dolayı, çalışma süresince malzeme bazında TSD-10-2876 kodlu projelerle destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

BURSA KARACABEY YÖRESİNDE ATLARDA *THEILERIA EQUI* VE *BABESIA CABALLI*'NİN REAL TIME PCR İLE ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

**T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Kasım 2012
Danışman: Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM**

ÖZET

Bu çalışmada, Bursa Karacabey yöresinde atlarda *Theileria equi* ve *Babesia caballi*'nin Real Time PCR ile moleküler prevalansının belirlenmesi ve elde edilen izolatların moleküler karakterizasyonlarının ortaya konması amaçlanmıştır. Bu amaçla Mayıs - Temmuz 2009 tarihleri arasında Karacabey Tarım İşletmesi Müdürlüğü'ne ait 153 ve Türkiye Jokey Kulübü Karacabey Pansiyonel Harasındaki 50 olmak üzere toplam 203 attan tekniğine uygun olarak kan örnekleri alınmıştır. Kan örneklerinden DNA ekstraksiyonunu takiben, *B. caballi* ve *T. equi*'nin 18S rRNA gen bölgesini parsiyel olarak amplifiye eden spesifik primerlerle TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. İncelemesi yapılan atlardan 10'u (%4,93) piroplasmosis yönünden pozitif bulunmuştur. Pozitif belirlenen örneklerin merkezlere göre dağılımı incelendiğinde Tarım İşletmesi Müdürlüğünden örneklenen 153 atın 4'ünde *T. equi*, 3'ünde *B. caballi* pozitifliği belirlenirken Türkiye Jokey Kulübünden örneklenen 50 atın 2'sinde *T. equi*, 1'inde ise *B. caballi* pozitifliği tespit edilmiştir. Araştırma yöresinde *T. equi*, ve *B. caballi*'nin prevalansı sırasıyla %2,96 ve %1,97 olarak saptanmıştır. 18S rRNA genini parsiyel olarak amplifiye eden primerler ile konvansiyonel PCR analizleri sonucunda *T. equi* pozitif 4 ve *B. caballi* pozitif 1 olmak üzere toplam 5 izolatın jel üzerinde amplifikasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Konvansiyonel PCR'ın Real Time PCR tekniği ile kıyaslanması sonucu %50,0 sensitivite ve %100,0 spesifite gösterdiği belirlenmiştir. PCR sonucu pozitif belirlenen 5 izolattan yalnızca *T. equi*'ye ait olan iki izolat sekans analizleri için uygun konsantrasyonda belirlenmiştir. 18S rRNA sekans analiz sonuçlarına göre Bursa Karacabey yöresinde atlardan elde edilen *T. equi* BK-1 ve BK-2 izolatlarının kendi aralarında %100 identik oldukları, dünyadaki diğer *T. equi* izolatlarıyla aralarında ortalama $2,5 \pm 0,6$ farklılık gösterdikleri ve *T. equi* Genotip E'de yer aldıkları saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: At, *Theileria equi*, *Babesia caballi*, Real Time PCR, Moleküler karakterizasyon

**INVESTIGATION OF *THEILERIA EQUI* AND *BABESIA CABALLI* BY REAL TIME
PCR IN HORSES IN KARACABEY REGION OF BURSA AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF THE ISOLATES**

**Erciyes University, Graduate School of HealthScience
Department of Veterinary Parasitology
Doctorate's Thesis, November 2012
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

ABSTRACT

This study was carried out to determine the molecular prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Karacabey region of Bursa and to designate the molecular characterization of the obtained isolates. For this aim between May and July of 2009, blood samples were technically collected from totally 203 horses, in which 153 were belong to Agricultural Management Directorate and 50 were belong to the Turkish Jockey Club Karacabey stud farm. Following the genomic DNA extractions from blood samples, TaqMan probe based Real Time PCR analyses were performed with the specific primers which partially amplified the 18S rRNA gene region of *B. caballi* and *T. equi*. 10 (4.93%) of the examined horses were found to be infected with piroplasmosis. When examining the distribution of the positive samples over the collection centers, 4 and 3 horses from Agricultural Management Directorate and 2 and 1 horses from Turkish Jockey Club were found to be positive for *T. equi* and *B. caballi*, respectively. The prevalence of *T. equi* and *B. caballi* in the research area were determined as 2.96% and 1.97%, respectively. According to the conventional PCR which partially amplifies the 18S rRNA gene region, totally 5 isolates, 4 from *T. equi* positive and 1 from *B. caballi*, were determined to give amplification on the agarose gel. Conventional PCR showed 50.0% sensitivity and 100.0% specificity when compared with the Real Time PCR. Only two out of 5 PCR positive isolates belong to *T. equi* were found to have suitable concentration for sequence analyses. BK-1 and BK-2 *T. equi* isolates obtained from horses of Bursa Karacabey region were determined to be 100.0% identical to each other and showed $2.5 \pm 0.6\%$ distance from other *T. equi* isolates from the world and also they were determined in the *T. equi* Genotype E.

Key words: Horse, *Theileria equi*, *Babesia caballi*, Real Time PCR, Molecular characterization

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
 1.GİRİŞ VE AMAÇ	 1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. SINIFLANDIRMA	3
2.1.1. Filogeni ve Genomik Yapı	5
2.2. MORFOLOJİ	6
2.3. PİROPLASMA TÜRLERİNİN BİYOLOJİSİ VE YAŞAM DÖNGÜSÜ	8
2.3.1. Tek Tırnaklılarda Gelişme.....	8
2.3.2. Vektör Kenelerdeki Gelişme	9
2.4. VEKTÖR KENELER.....	11
2.5. EPİDEMİYOLOJİ.....	11
2.5.1. Piroplasmosis'in Dünya'daki Yayılışı.....	12
2.5.2. Piroplasmosis'in Türkiye'deki Yayılışı	14
2.6. PATOGENEZ	18
2.7. KLİNİK SEMPTOMLAR.....	19
2.8. NEKROPSİ BULGULARI	21
2.9. BAĞIŞIKLIK.....	23
2.10.TEŞHİS	24
2.10.1. Mikroskopik Muayene ile Teşhis	24
2.10.2. Serolojik Yöntemler ile Teşhis.....	25
2.10.3. Immunochromatographic Test (ICT) ile Teşhis.....	26
2.10.4. Moleküler Yöntemler ile Teşhis.....	26
2.11. TEDAVİ	28
2.12. KORUNMA	28

	<u>Sayfa no</u>
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. SAHA ÇALIŞMALARI.....	30
3.1.1. Araştırma Sahası	30
3.1.2. Kan Örneklerinin Toplanması	31
3.2. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI.....	32
3.2.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu	32
3.2.2. Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR)	32
3.2.3. 18S rRNA Geninin Amplifikasyonu	33
3.2.4. 18S rRNA Geninin Sekansı ve Filogenetik Analizi	34
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. REAL TIME PCR SONUÇLARI.....	35
4.2. 18S rRNA GENİNİN AMPLİFİKASYON SONUÇLARI	39
4.3. REAL TIME PCR VE KONVANSİYONEL PCR SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI	40
4.4. ATLARDA PİROPLASMOSİS’İN PREVALANSINDA YAŞ, CİNSİYET VE İRK FAKTÖRLERİNİN ANALİZİ.....	40
4.5. 18S rRNA GENİNİN SEKANSI	42
4.6. 18S rRNA GENİNİN FİLOGENETİK ANALİZİ	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	55
6. KAYNAKLAR	63
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLOLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. <i>Babesia caballi</i> 'nin taksonomideki yeri.	4
Tablo 2.2. <i>Theileria equi</i> 'nin taksonomideki yeri.....	4
Tablo 2.3. At piroplasmosis'inde vektörlük yapan kene türleri.....	11
Tablo 2.4. Türkiye'de atlarda <i>B. caballi</i> ve <i>T. equi</i> 'nin prevalansına yönelik yapılan çalışmalar (1997-2012).....	16
Tablo 3.1. Bursa Karacabey yöresinde incelenen atların örnekleme merkezi yaş, ırk ve cinsiyete göre dağılımları	31
Tablo 3.2. <i>B. caballi</i> ve <i>T. equi</i> için Real Time PCR'da kullanılan primer ve TaqMan probolar.....	32
Tablo 4.1. Real Time PCR incelemesi yapılan atlarda piroplasmosis pozitifliğinin örnekleme merkezlerine göre dağılımı.	36
Tablo 4.2. İncelenen hayvanlarda Konvansiyonel ve Real Time PCR (Gold test) analiz sonuçlarının karşılaştırılması	40
Tablo 4.3. Atlarda piroplasmosis prevalansının türlere göre yaş, cinsiyet ve ırkla ilişkisi.....	41
Tablo 4.4. Pozitif belirlenen örneklerde saptanan Ct (dR) değerlerinin parazit türüne göre dağılımı	43
Tablo 4.5. Bursa Karacabey yöresinde atlarda belirlenen izolatların incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler ve GenBank aksesyon numaraları	44
Tablo 4.6. Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer <i>T. equi</i> izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler.	45
Tablo 4.7. Multiple alignmentları yapılan <i>T. equi</i> izolatları ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları.	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Atlarda piroplasmosis'e neden olan etkenlerinde yer aldığı filogenetik ağaç ..	6
Şekil 2.2. <i>B. caballi</i> piroplasmları	7
Şekil 2.3. Eritrositlerde <i>T. equi</i> piroplasmları	7
Şekil 2.4. <i>Theileria equi</i> 'nin yaşam çemberi	10
Şekil 2.5. Yeni doğan tayda, doğumdan sonraki 10. saatte sklera ve konjunktivada sarılık	20
Şekil 2.6. Piroplasmosis'li bir atın nekropsisi sonucu görülen solgun renkli kalp ve konjesyonlu akciğer	21
Şekil 2.7. Piroplasmosis'li bir atın nekropsisinde görülen yaygın ikterus	22
Şekil 2.8. Piroplasmosis'li atın böbreğinde görülen ikterus	22
Şekil 3.1. Karacabey Tarım İşletmesi Müdürlüğü'ne ait örnekleme istasyonları	30
Şekil 3.2. Türkiye Jokey Kulübü'ne ait örnekleme istasyonları	31
Şekil 4.1. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu <i>T. equi</i> pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon grafikleri.	36
Şekil 4.2. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu <i>B. caballi</i> pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon grafikleri.	37
Şekil 4.3. <i>T. equi</i> ve <i>B. caballi</i> pozitif saptanan bazı örneklerin duplex TaqMan Real Time PCR da amplifikasyon grafikleri.....	37
Şekil 4.4. Real Time PCR'da <i>T. equi</i> pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı	38
Şekil 4.5. Real Time PCR'da <i>B. caballi</i> pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı	38
Şekil 4.6. <i>B. caballi</i> Real Time PCR standart kiti (PrimerDesign Ltd, Genesig, İngiltere) ile bazı örneklerde saptanan amplifikasyon eğrileri	39
Şekil 4.7. Piroplasm türlerinin parsiyel 18S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü	39
Şekil 4.8. <i>T. equi</i> 'ye ait iki izolatın jel pürifikasyon sonrası 18S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile tekrar PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü	43

Sayfa No

Şekil 4.9.	<i>T. equi</i> 'ye ait iki izolatın tekrar jel pürifikasyon sonrası ampikonların jel elektroforezde görünümü	43
Şekil 4.10.	<i>T. equi</i> BK-1 izolatının sekans dizilimleri	44
Şekil 4.11.	<i>T. equi</i> BK-2 izolatının sekans dizilimleri	44
Şekil 4.12.	GenBank'a kayıtları yapılan <i>T. equi</i> izolatlarının ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların 18S rRNA gen dizilimlerinin pairwise analizleri	47
Şekil 4.13.	Bursa Karacabey yöresinde atlarda belirlenen <i>T. equi</i> izolatları ile Dünyadaki diğer bazı <i>T. equi</i> izolatlarının parsiyel 18S rRNA gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları	52
Şekil 4.14.	Bursa Karacabey yöresinde saptanan <i>T. equi</i> izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer <i>T. equi</i> izolatların 18S rRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları	54

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada son zamanlarda teknolojinin de gelişmesiyle birlikte meydana gelen hızlı makineleşme sonucu atların hayatımızdaki yerinin azaldığı düşünülse de özellikle kırsal bölgelerde hala atlardan faydalanılmakta, bunun yanında spor ve turizm amacı ile at yetiştiriciliği yapılmakta ve ayrıca atlar, insan ve hayvan sağlığı için laboratuvarlarda serum üretiminde kullanılmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre Türkiye’de 1991 yılında 495.543 baş at bulunurken, 1999 yılında 333.000 baş, 2011 yılında ise 151.230 baş at bulunduğu bildirilmektedir. Bunlardan 2.234 baş at Bursa ilinde, 440 baş at ise Bursa’nın Karacabey yöresinde bulunmaktadır (1).

Özellikle spor amaçlı kullanılan atların viral, bakteriyel ve paraziter etkenler ile enfekte olması, önemli derecede performans kayıplarına ve hatta ölümlere neden olmaktadır. Ülke ekonomisine katkısı göz önüne alındığında özellikle spor amaçlı kullanılan atların diğer atlara oranla çok daha değerli ve önemli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle hem performans kayıplarını önlemek hem de ölümlerin önüne geçmek amacıyla diğer kontrollerin yanı sıra atlarda parazitolojik kontrollerin düzenli yapılması, hastalığın teşhisinin en hassas ve doğru şekilde yapılması, buna göre koruyucu tedbirlerin zamanında alınması gerekmektedir.

Türkiye’de günümüze kadar atlarda *Theileria equi* (Syn. *Babesia equi*, Laveran, 1901) ve *Babesia caballi* (Nuttall, 1910) etkenlerinin neden olduğu piroplasmosis olguları üzerine çalışmaların daha çok konvansiyonel ve serolojik yöntemlerle yapıldığı,

moleküler çalışmaların sayısının çok sınırlı olduğu, moleküler tiplendirme çalışmalarının ise olmadığı görölmektedir. Hâlbuki söz konusu hastalıklarda bulaşma dinamiklerinin belirlenmesi, epidemiyolojik faktörlerin analizi ve etkili kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde enfeksiyona yol açan tür ve genotiplerin saptanması oldukça önemlidir. Bu çalışma, Bursa Karacabey yöresinde atlarda *Theileria equi* ve *Babesia caballi*'nin Real Time PCR ile araştırılması, moleküler prevalansının belirlenmesi ve elde edilen izolatların Dünyadaki diğer izolatlarla filogenetik ilişkilerinin araştırılması amacıyla planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Dünyada tropik ve subtropik bölgelerde yaygın olarak görülen tek tırnaklı piroplasmosis'i; *Babesia caballi* ve *Theileria equi*'nin neden olduğu, *Ixodidae* ailesine bağlı kenelerle transovarial (sadece *B. caballi*) ve transstadial yolla nakledilen, zoonotik önemi olmayan bir protozoon hastalığıdır (2-5).

Geçmişte hastalık; antrax humması (anthrax fever), safra humması (biliary fever), peteşi humması, at vebası, tek tırnaklı sıtması ve nuttaliosis gibi isimlerle de adlandırılmıştır (6-8). Tek tırnaklılarda ilk piroplasmosis olgusunun Hutcheon'a atfen 1893'de Natal de Wiltshire'da görüldüğü ve hastalığın beygirlerin "fièvre bilieuse" olarak adlandırıldığı; Guglielmi'ye atfen İtalya'da ilk tek tırnaklı piroplasmosis olgusunun 1899'da "Beygir Malaryası" adı altında rapor edildiği; Nuttal'a atfen 1910 yılında tek tırnaklılarda *Piroplasma caballi* ve *Nuttalia equi* adında iki ayrı türün bulunduğu bildirilmiştir (9).

Türkiye'de ise atlarda klinik piroplasmosis olgusunun Samuel ve Cafer Fahri'ye atfen Balkan Savaşı sırasında görüldüğü; daha sonrada Samuel ve Köylüoğlu'na atfen 1930'da Bursa Karacabey'de ortaya çıktığı bildirilmiştir (9, 10).

2.1. SINIFLANDIRMA

Atlarda piroplasmosis'e neden olan türlerden *Babesia caballi* Nuttal, 1910, *Apicomplexa* kök altında, *Aconoidasida* Mehlhorn ve ark., 1980 sınıfında, *Piroplasmida* Wenyon, 1926 dizisinde, *Babesiidae* Poche, 1913 ailesinde, *Babesia* Starcovici, 1893,

soyunda yer almaktadır. Önceki yıllarda *Babesia equi* olarak adlandırılan ancak son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu omurgalıda lenfositler şizogoninin gözlenmesi ve vektör kenede transovarial geçiş olmaması nedeniyle *Theileria equi* (Syn. *Babesia equi*) Laveran, 1901, olarak adlandırılan diğer piroplasmosis etkeni ise, yine *B. caballi* ile aynı dizide yer almakta ancak *Theileriidae* Du Toit, 1918, ailesinde ve *Theileria* Bettencourt ve ark., 1907, soyunda bulunmaktadır (2, 11, 12), (Tablo 2.1, 2.2).

Tablo 2.1. *Babesia caballi*'nin taksonomideki yeri.

Sınıflandırma
Kökaltı: Apicomplexa
Sınıf: Aconoidasida, Mehlhorn ve ark., 1980
Dizi: Piroplasmida, Wenyon, 1926
Aile: Babesiidae, Poche, 1913
Soy: Babesia, Starcovici, 1893
Tür: Babesia caballi Nuttal, 1910

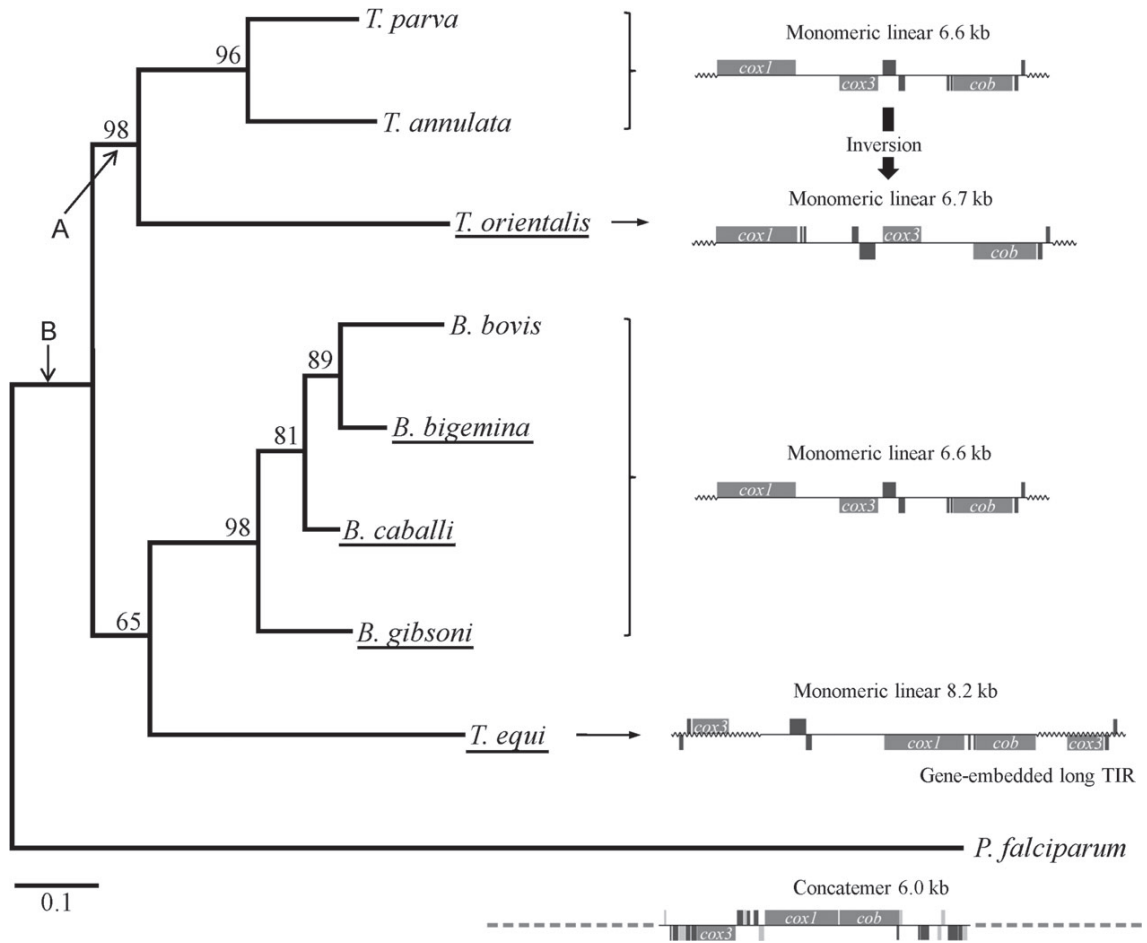
Tablo 2.2. *Theileria equi*'nin taksonomideki yeri.

Sınıflandırma
Kökaltı: Apicomplexa
Sınıf: Aconoidasida, Mehlhorn ve ark., 1980
Dizi: Piroplasmida, Wenyon, 1926
Aile: Theileriidae, Du Toit, 1918
Soy: Theileria, Bettencourt ve ark., 1907
Tür: Theileria equi, Laveran, 1901

2.1.1. Filogeni ve Genomik Yapı

Çoğunluğu memelilerde piroplasmosis'e yol açan çok sayıda tür tanımlanmış olup, günümüzde halen bazılarının sistematikteki yeri tartışmalı bulunmaktadır. Bu türlerden *Babesia equi*'nin filogenetik analizi sonucunda, *Theileria* soyunda yer alması ve adının da *Theileria equi* olarak değiştirilmesi kabul edilmiştir. Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucu yeni *Babesia* grupları ortaya çıkmış, atlarda piroplasmosis'e neden olan etkenlerden *B. caballi* de, *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. ovis*, gibi toynaklıların *Babesia* türlerinden ve sığırların diğer *Babesia* türlerinden oluşan "Ungulibabesidler" adı verilen gruba dahil edilmiştir (13).

Her filogenetik grup, büyüklük ve yapı farklılıkları olan mitokondriyal genoma sahiptir. Farklı grupların mitokondriyal genomik yapıları, kendi aralarında önemli ölçülerde değişiklikler göstermektedir. *Babesia* veya *Theileria* soylarına ait türlerin mitokondriyal genomları 6,6kb büyüklüğünde olup, bu soya yakın olan diğer türlere (*Plasmodium* spp.) kıyasla daha küçüktür. *Theileria equi* ise diğer *Theileria* türlerinden farklı olarak daha büyük bir mitokondriyal genoma sahiptir (8,2 kb), (14). Son yıllarda yapılan çalışmalarla piroplasmosis etkenlerinin filogenetik ağacı Şekil 2.1'de gösterildiği gibi belirlenmiştir (14). Bunun yanında, *B. caballi* ve *T. equi* etkenlerinin 18S rDNA gen bölgesi üzerinde yürütülen çalışmalarda, *B. caballi*'nin 2, *T. equi*'nin ise 5 genotipinin olduğu bildirilmiştir (15).



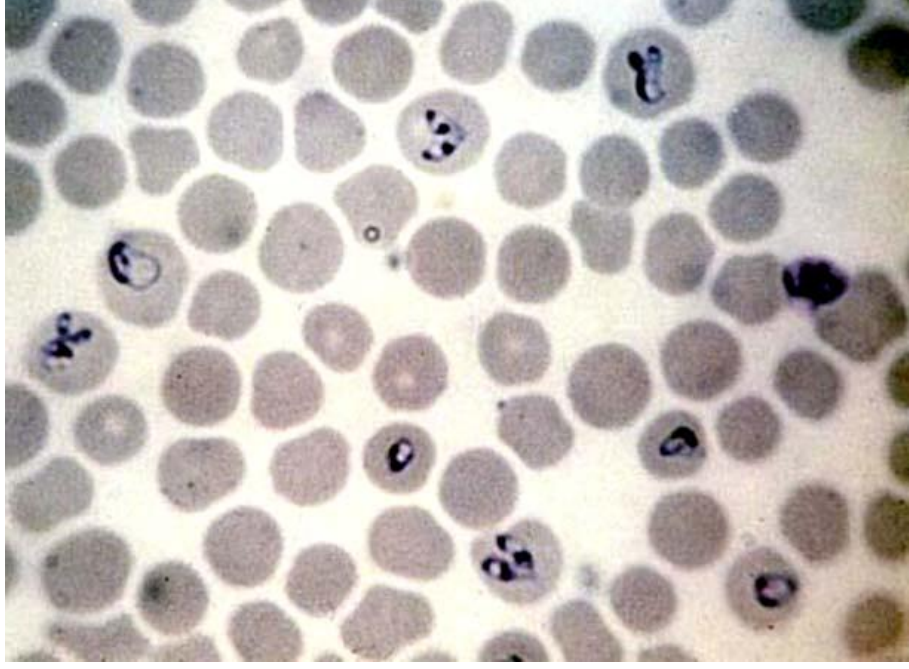
Şekil 2.1. Atlarda piroplasmosis'e neden olan *T. equi* ve *B. caballi*'nin yer aldığı filogenetik ağaç.

(Kaynak: Hikosaka ve ark, 2010: 14)

2.2. MORFOLOJİ

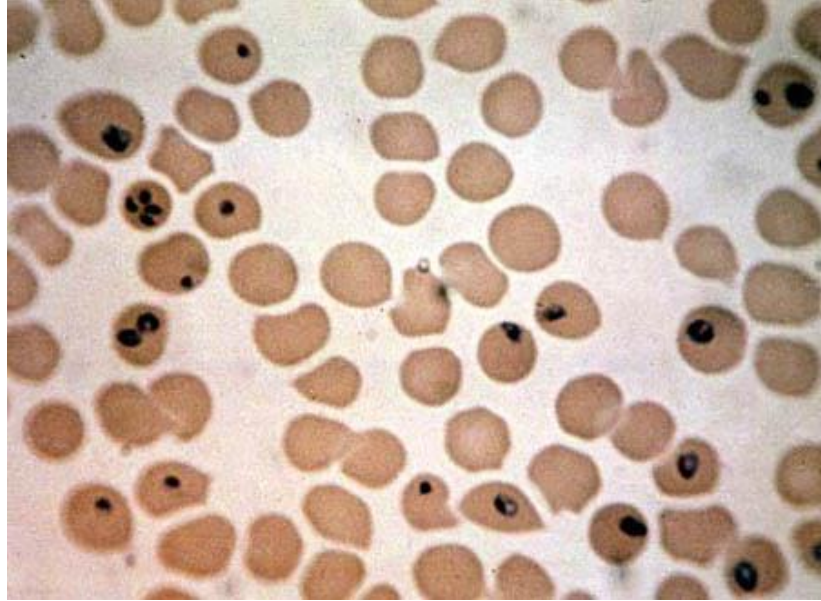
Atlarda piroplasmosis'e yol açan etkenlerden *B. caballi* ve *T. equi* gelişmelerinin belirli dönemlerinde apical kompleksi oluşturan elektron mikroskopik organellere sahiptirler.

Babesia caballi, 2-5 µm büyüklüğünde olup eritrositler içinde amoeboid, oval, yuvarlak genellikle tek veya çift armut formunda bulunmaktadır. Morfolojik olarak *Babesia bigemina*'ya benzeyen etken, ikili armut formunda görülmektedir. Merozoitlerde roptri, mikrotubuller, ribozom ve endoplazmik retikulum bulunmaktadır (16-18), (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. *B. caballi* piroplasmları (**Kaynak:** <http://www.kmle.co.kr/search.php?Search=Babesia%20caballi>)

Theileria equi ise 1,5-3 μm büyüklüğünde olup yuvarlak, oval, amoeboid veya armut formunda bulunmaktadır. Karakteristik olarak bölünme şekli Malta haçına (dörtlü haç formu) benzemekle beraber yuvarlak, oval ve armut şeklinde de görülebilmektedir (6, 8, 16-18), (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Eritrositlerde *T. equi* piroplasmları (**Kaynak:** <http://www.vetnext.com/search.php?s=aandoening&id=73060442801%20469>)

2.3. BİYOLOJİ

Babesia caballi ve *T. equi* heteroxen hayat siklusuna sahip protozoonlardır. Yaşam döngülerinde, sıcakkanlı omurgalılar son konak, *Ixodidae* ailesindeki bazı kene türleri ise ara konak vazifesi görmektedir (10).

2.3.1. Tek Tırnaklılarda Gelişme

***Theileria equi*:**

Tek tırnaklılar içinde piroplasmosis'e en duyarlı hayvanların atlar olduğu belirtilmiştir (19, 20). *Theileria equi*'de, kenelerin tükürük bezi asini hücrelerinde bulunan sporozoitler, kene tarafından kan emme esnasında konağa aktarılmakta ve 5 - 8 gün içerisinde önce lenf yumrularına, daha sonra lenfoblastoid hücrelere girerek şizogoni (merogoni) ile çoğalmaktadırlar. Takip eden periyotta, çoğalan şizontlar konak hücreyi de bölünmeye teşvik ederler. Şizogoni neticesinde, önce az sayıda büyük çekirdekli makroşizontlar, daha sonra da makroşizontlardan çok sayıda küçük çekirdekli mikroşizontlar oluşur. Lenfositlerin parçalanmasıyla, mikroşizont içinde gelişen çok sayıda merozoit (lenfositlerin sitoplazmaları içerisinde gelişen şizontlara, ilk defa tespit eden şahsa atfen Koch Cisimciği adı verilmektedir) serbest hale gelir ve eritrositlere girerek halka, amaboid ve dörtlü haç formunda gelişmelerini ve çoğalmalarını sürdürürler. Enfekte eritrositlerin parçalanmasından sonra açığa çıkan etkenler diğer eritrositlere girerek aynı şekilde gelişimine devam etmektedirler (7, 21- 23).

***Babesia caballi*:**

Babesia caballi'de, *T. equi*'den farklı olarak vektör kene türleri tarafından konağa aktarılan sporozoitler lenf yumrularına uğramadan doğrudan konak eritrositlerine girerek piroplasmlar (trofozoit) haline dönüşürler. Trofozoitler ikiye veya dörde bölünerek kız hücreleri (merozoitler) meydana getirir. Enfekte eritrositin parçalanması sonucu serbest kalan merozoitler, diğer sağlam eritrositlere girerek onları da enfekte ederler. Bu şekilde enfeksiyon konağın ölümüyle, konağın direnç (immunité) kazanıp parazitleri temizlemesiyle ya da premunisyonla sonuçlanır (21, 22, 24, 25).

Ayrıca *B. caballi* ve *T. equi*'nin gebelerde fötüse geçebildiği de (intrauterin bulaşma) bildirilmiştir (7, 23, 26, 27).

2.3.2. Vektör Kenelerdeki Gelişme

Vektör keneler, hastalık etkenlerini bir konaktan diğerine ya transstadial ya da transovarial-vertikal yolla nakletmektedirler. Atlarda piroplasmosis'e neden olan etkenlerden *T. equi*'de sadece transstadial nakil görülürken *B. caballi*'de ise hem transstadial hem de transovarial nakil görülmektedir (6, 16, 28, 29).

***Theileria equi*:**

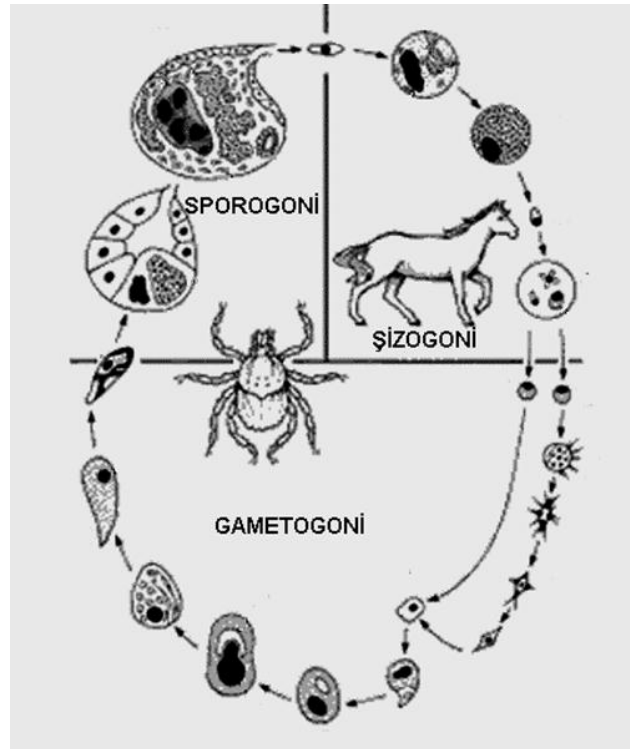
Theileria equi, vektör kenenin enfekte hayvandan kan emmesiyle birlikte, kenenin orta bağırsağına geçer. Burada enfekte eritrositlerin sindirilmesini takiben piroplasm formlar serbest hale geçer. Bunların içinden özellikle halka formlar gelişmeye uğrayarak bir kısmı mikrogamontu ve takiben mikrogametleri oluştururlar. Diğerleri ise yuvarlak makrogamontları oluşturur ve bunlardan da makrogametler meydana gelir. Neticede kene bağırsağında mikrogamet ile makrogametin birleşmesi sonucu zigot oluşur. Zigot mide duvarını delerek hemolenfe geçer ve uzayarak ookinet halini alır. Hareketli olan ookinetler tükürük bezlerine geçerek sporogoni dönemine girer ve önce sporoblastlar, daha sonra da sporozoitler oluşur. Kene gömlek değiştirip yeni bir konağı enfekte etmesinden kısa bir süre önce parazitler aktive olarak kenenin tükürük bezi asini hücrelerinin sitoplazmaları içerisinde sporozoitler şekillenir. Kan emmeye devam eden kenelerin, sporozoitleri kan emdikleri yeni konağa vermeleri ile parazitler bir hayvandan diğerine nakledilmiş olur (8, 23, 30, 31).

Etkenler önce nimf safhasındaki kenenin tükürük bezinde sporogoni ile çoğalır. Meydana gelen sporozoitler kene erişkin olduğunda da çoğalmaya devam ederek ikinci nesil sporozitleri meydana getirirler. Meydana gelen her iki tip sporozoit de enfektiftir (21, 22).

***Babesia caballi*:**

Babesia caballi'de, *T. equi*'den farklı olarak ayrıca transovarial nakil de görülmektedir. Vektör kenenin enfekte konaktan emdiği kanın kenenin orta bağırsağına geçmesiyle enfekte eritrositlerle alınan gamontlardan (gametositler) "strahlenkörper" adı verilen, çıkıntılı formdan ışınal cisimciklerinin (ray-bodies) iki popülasyonu oluşur. Çok çekirdekli ışınal cisimciklerin bir araya gelmesiyle büyük topluluklar oluşur. Bir kez bölünme olduğunda gametler olduğu varsayılan haploid sayıda tek çekirdekli ışınal cisimcikler meydana gelir. Daha sonra bu yapıların bir çifti bir araya gelerek syngami

yoluyla küresel hücre (spherical cell) olarak adlandırılan zigotu oluşturur. Oluşan zigot hareketlidir ve kene bağırsağında tercihen sindirim hücrelerini enfekte eder. Muhtemelen burada çoğaldıktan sonra, vitellojen sentezleyen bazofilik hücelere yerleşir. Burada daha fazla bölünmeyle hareketli ookinetler (vermiküller, sporokinetler) meydana gelir. Vermiküller, zigotu parçalayarak bağırsak boşluğuna dökülürler ve bağırsak epitelyum hücrelerine, malpighi tubuluslarına, epidermis hücrelerine, kaslara, hemolenfe giderek gelişmelerini sürdürürler. Kene bağırsak hücrelerinde, poliploid kinetlerin (vermiküller, sporokinetler, büyük merozoitler) şekillenmesiyle şizogoni (çoğa bölünme, sporogoni) oluşur. Bu çomak şekilli (club-shaped) hareketli kinetler, kenenin hemolenfine geçerek ovaryumlar (oocytler) dahil olmak üzere değişik tipte hücre ve dokuları enfekte ederler ki, buralarda sekonder şizogoninin tekrarlayan siklusu gerçekleşir. Böylece, enfekte kenenin yumurtalarıyla larval döneme transovarial nakil gerçekleşir. Transovarial enfekte larvalarda kinetler, tükürük bezi hücrelerine girerler ve çok çekirdekli dönemlere transforme olurlar. Sporogoni ile önce sporoblastlar, sonra sporoblastların parçalanmasıyla küçük, haploid sayıda sporozoitler meydana gelir. Paraziti (sporozoit) duyarlı hayvanlara, vektör kene türlerinin larva dönemi dışında kalan nimf ve ergin (erkek ve dişi) dönemleri nakledilebilir (Şekil 2.4), (21, 22).



Şekil 2.4. *T. equi*'nin yaşam çemberi (Kaynak: Mehlhorn ve Schein, 2008: 32.)

2.4. VEKTÖR KENELER

Hastalık etkenleri bir hayvandan diğerine *Ixodidae* ailesinden çeşitli kene türleriyle nakledilmektedir.

Dünya’da *B. caballi*’nin vektörlüğünü, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor nitens*, *Dermacentor silvarum*, *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Hyalomma dromedarii*, *Rhipicephalus bursa* ve *Rhipicephalus sanguineus* türleri yapmaktadır. Türkiye’de ise bu türe *D. marginatus*, *H. a. excavatum*, *R. bursa* ve *R. sanguineus* türleri vektörlük yapmaktadırlar (8, 16, 28, 23), (Tablo 2.3).

Yine Dünya’da *T. equi*’nin vektörlüğünü, *Rhipicephalus evertsi*, *Rhipicephalus turanicus*, *R. sanguineus*, *R. bursa*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *H. anatolicum excavatum* türleri yapmaktadır. Bunlardan Türkiye’de *R. bursa*, *R. sanguines*, *R. turanicus*, *D. marginatus*, *H. anatolicum excavatum*, *H. anatolicum anatolicum* türleri bulunmaktadır. (8, 16, 28, 23), (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. At piroplasmosis’inde vektörlük yapan kene türleri

Hastalık Etkeni	Vektör Kene Türleri
<i>Babesia caballi</i>	<i>Dermacentor marginatus*</i> , <i>Dermacentor reticulatus</i> , <i>Dermacentor nitens</i> , <i>Dermacentor silvarum</i> , <i>Hyalomma anatolicum excavatum*</i> , <i>Hyalomma dromedarii</i> , <i>Rhipicephalus bursa*</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus*</i>
<i>Theileria equi</i>	<i>Dermacentor marginatus*</i> , <i>Dermacentor reticulatus</i> , <i>Hyalomma anatolicum anatolicum*</i> , <i>Hyalomma anatolicum excavatum*</i> , <i>Rhipicephalus evertsi</i> , <i>Rhipicephalus turanicus*</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus*</i> , <i>Rhipicephalus bursa</i>

*Türkiye’de vektörlük yapan kene türleri.

2.5. EPİDEMİYOLOJİ

Atlarda piroplasmosis, Dünya’nın hemen her ülkesinde, vektör kenelerin bulunabildiği her yörede görülebilmektedir. Uluslararası öneme sahip olan bu hastalık, özellikle spor amaçlı kullanılan atların bir bölgeden bölgeye veya ülkeden ülkeye taşınmasında dikkat edilmesi gereken en büyük problemlerden biri olarak nitelendirilmektedir (33).

Epidemiyolojide, bölge iklim şartları, coğrafik durumu, mevcut kene türleri, bu kenelerin mevsimsel aktiviteleri, konaktaki vektör kene yoğunluğu ve önceden oluşmuş hastalık şekilleri değerlendirilmektedir (26, 34, 35). Bunun yanında, hayvanın yaşı, ırkı ve çevredeki hastalık durumu da piroplasmosis'in epidemiyolojisinde oldukça önemli faktörlerdendir (22).

Piroplasmosis kenelerin ekolojik özelliklerinden dolayı mevsimsel olarak seyretmekte, bu nedenle hastalık, bölge özelliklerine göre kenelerin aktif olduğu ilkbahar ve yaz aylarında daha çok görülmektedir (36).

2.5.1. Dünyadaki Yayılışı

Atlarda piroplasmosis, Güney Avrupa, Asya, Rusya, Afrika, Güney Amerika, Orta Amerika ve Amerika Birleşik Devletleri'nin güney bölgelerinde görülmektedir (2, 37). Dünyadaki at popülasyonunun sadece %10'unun, piroplasmosis'den ari bölgelerde yaşadığı saptanmıştır (2).

Miks enfeksiyonlar dışında *T. equi* enfeksiyonları, *B. caballi* enfeksiyonlarına oranla Dünyada daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (16).

Amerika Birleşik Devletleri'nde serolojik yöntemlerle yapılan çalışmalarda, *B. caballi* ilk defa 1961'de, *T. equi* ise 1965 yılında tespit edilmiştir (38-40). Son yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nin Texas Eyaletinde yapılan bir çalışmada, 359 at serolojik yöntemlerle incelenmiş atların 292'si (%81,1) *T. equi* yönünden pozitif olarak saptanmıştır (41). Yine Amerika Birleşik Devletleri'nin Florida Eyaletinde yapılan diğer bir çalışmada ise 210 at incelenmiş ve atların 20'sinde *T. equi* etkeni saptanırken, *B. caballi* etkenine rastlanılmamıştır (42).

Hastalığın Macaristan, İspanya, İtalya, Portekiz, Fransa, Hindistan ve Rusya'nın geniş bir alanında endemik, Polonya Belçika, İsviçre, Çek Cumhuriyeti'nde ise sporadik olduğu tespit edilmiştir (20, 43, 44).

İngiltere'de vektör kenelerin bulunmasına rağmen hastalığın görülmediği kaydedilmiştir (2, 45, 46). Bunun yanında, Avustralya'da vektör kenelerin bulunmadığından dolayı hastalık, at ithalatı sırasında, dışardan getirilen enfekte atlar ile sınırlı kalmıştır (2, 47).

İsrail'de 361 attan alınan serum örneği ile IFAT yapılmış ve atların üçte birinin serolojik olarak *T. equi* pozitif olduğu saptanmıştır (48).

Brezilya'da 47 ata ait serum örneği Lateks Aglutinasyon Testi (LAT) ve ELISA ile analiz edilmiş, bunların 38'i *T. equi*, 42'si *B. caballi* enfeksiyonu yönünden seropozitif bulunmuştur (49).

Güney Afrika'da atlardan toplanan 6350 serum örneğiyle yapılan serolojik araştırmalarda, atların %80'inin *T. equi*, %50'sinin de *B. caballi* yönünden seropozitif olduğu tespit edilmiştir (50).

Moğolistan'da 254 at üzerinde ELISA kullanılarak yapılan bir çalışmada *T. equi* %72,8, *B. caballi* %40,1, miks enfeksiyonların ise %30,7 oranlarında pozitif bulunduğu bildirilmiştir (51).

Çin'de ELISA kullanılarak 111 at üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise *T. equi* %36, *B. caballi* %32, miks enfeksiyonların oranı ise %12 bulunmuştur (52).

İspanya'nın güney bölgesinde 537 at üzerinde yapılan bir çalışmada, atların 61'i *B. caballi* yönünden seropozitif bulunurken 270'i ise *T. equi* yönünden seropozitif bulunmuştur. Bu atların 24'ü ise hem *B. caballi* hem de *T. equi* yönünden miks seropozitif saptanmıştır (53).

Fransa'da yapılan bir çalışmada, 424 at üzerinde yapılan serolojik çalışmalar sonucu atların %64,4'ü *T. equi*, %19,7'si *B. caballi* etkenlerinin varlığı yönünden pozitif bulunmuştur (54).

İtalya'da 294 at üzerinde hem serolojik hem de moleküler yöntemlerle yapılan çalışmalarda, atların %8,2'si *T. equi*, %0,3'ü *B. caballi* seropozitif bulunmuş, aynı atlar üzerinde yapılan moleküler çalışmada ise (PCR) atların %33'ü *T. equi* yönünden pozitif bulunurken, *B. caballi* etkeni saptanamamıştır (55).

Kore Cumhuriyeti'nde 184 at serumu üzerinde cELISA yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, 2 (%1,1) at serumunda *T. equi* seropozitif bulunurken *B. caballi* tespit edilememiştir. Aynı zamanda bu sonuçlar moleküler yöntemler kullanılarak da doğrulanmıştır (56).

Brezilya'da 570 at üzerinde yapılan bir çalışmada, elde izolatlar konvansiyonel, serolojik ve moleküler yöntemlerle incelenmiş ve konvansiyonel tekniklerle yapılan araştırmalar sonucu 35 atta piroplasmosis etkenleri saptanırken, serolojik tekniklerle yapılan incemelerde ise atların %91'inde *T. equi*, %83'ünde *B. caballi* seropozitif olarak bulunmuştur. Moleküler teknikler kullanılarak yapılan testler sonucunda da

atların %59'u *T. equi*, %12,5'i ise *B. caballi* olarak teşhis edilmiştir (57). Aynı ülkenin Sao Paulo eyaletinde yapılan bir çalışmada ise 582 at serum örneği ELISA ve Complement Fixation Test (CFT) yöntemleri ile incelenmiş ve %54,1 *B. caballi*, %21,6 *T. equi* etkenleri yönünden seropozitiflik saptanmıştır (58).

Polonya'da piroplasmosis klinik semptomları gösteren 3 at üzerinde yapılan moleküler çalışmalar sonucu, söz konusu atların tümü piroplasmosis pozitif bulunmuş ve daha sonra bu izolatların moleküler tiplendirmesi yapılarak saptanan etkenlerin *T. equi* ile identiklik gösterdiği bildirilmiştir (59).

Güney Afrika'da 41 at üzerinde yürütülen bir çalışmada, equine piroplasmosis'i saptamak amacıyla moleküler yöntemler kullanılmış (qPCR), atların 19'u *T. equi* pozitif bulunurken, söz konusu atlarda *B. caballi* etkeni saptanamamıştır (60).

Dubai'de yapılan bir çalışmada, 105 at serumu örneği IFAT ve cELISA yöntemleri ile serolojik olarak, real time PCR yöntemi ile de moleküler olarak incelenmiştir. Çalışmada, 38 at serumu equine piroplasmosis yönünden seropozitif bulunurken, 33 at serumu ise uygulanan real time PCR yöntemi sonucu equine piroplasmosis yönünden pozitif bulunmuştur (61).

Yunanistan'da yapılan bir çalışmada, 524 attan alınan serum örnekleri cELISA yöntemiyle incelenmiş, atların %11'i *T. equi*, %2,2'si ise *B. caballi* seropozitif olarak saptanmıştır (62).

2.5.2. Türkiye'deki Yayılışı

Türkiye'de tek tırnaklı piroplasmosis'i üzerine sınırlı sayıda mikroskopik (9, 18, 63-71); serolojik (8, 72-82) ve moleküler (12, 83) çalışmalar yapılmıştır.

B. caballi'nin mikroskopik prevalansı; Gemlik Askeri Harası atlarında %12 (18); Malatya Sultansuyu Harası atlarında %3 (71); Kayseri yöresinde atlarda %7,86, katırlarda %4,34 ve eşeklerde %5,26 (70); Ankara'da spor ve gösteri atlarında babesiosis'in mikroskopik prevalansı %3 bulunmuştur (12).

Türkiye'de atlarda babesiosis'in seroprevalansı, ilk olarak Doğu Anadolu sınır bölgelerinde IFAT ile (72) ve hemen hemen aynı dönemde Türkiye'nin bütün coğrafik bölgelerinde IFAT ve CFT ile (84) araştırılmıştır. *B. caballi*'nin seropozitifliği, IFAT ile Doğu Anadolu sınır bölgesinde atlarda %4,5 (72); Türkiye genelinde IFAT ile %11,1, CFT ile %0,9 (84); Marmara'da IFAT ile %13,3, CFT ile %1; Ege'de IFAT ile %7 (73);

Malatya’da IFAT ile %2,5 (76); Akdeniz bölgesinde IFAT ile %30, CFT ile %1,81 ve Karadeniz Bölgesinde IFAT ile %12,5 (76) olarak saptanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise Türkiye genelinde CFT ile %0,58 (77), cELISA ile %1,46 (78), Karadeniz Bölgesinde IFAT ile %38 (79), Niğde ilinde IFAT ile %9,6 (80), Kars ve Ardahan yöresinde cELISA ile 29,3 (81) tespit edilmiş, Kurt ve Yaman (82) ise Adana ilinde 220 atta cELISA yöntemi ile yapılan araştırmada *B. caballi*’ye karşı antikorları tespit edememişlerdir.

Türkiye’de atlarda piroplasmosis, moleküler yöntemlerle ilk olarak Ankara’da gösteri ve spor atlarında araştırılmış ve *B. caballi* pozitifliği %3 bulunmuştur (12), (Tablo 2.4).

Türkiye’de *T. equi*’nin mikroskopik prevalansı; Gemlik Askeri Harasın’da %6 (18); Malatya Sultansuyu Harası’nda %11,5 (71); Kayseri yöresinde tektırnaklılarda subklinik babesiosis %15,33, atlarda %4,49, katırlarda %4,34 ve eşeklerde %2,63 (70); Doğu Anadolu sınırında %58,18’dir (72).

T. equi’nin seropozitifliği; Doğu Anadolu’nun sınır bölgesinde IFAT ile %64,5 (72), Türkiye genelinde IFAT ile %25,7, CFT ile %19,7 (84), Marmara’da IFAT ile %3,8, CFT ile %4,8, Ege’de IFAT ile %42, CFT ile %30 (73), IFAT ile Kars yöresinde %25 (74), Malatya’da IFAT ile %20,5, CFT ile %18 (75), Akdeniz bölgesinde IFAT ile %23,5, CFT ile %11,8 ve Karadeniz Bölgesinde IFAT ile %15,7 ve CFT ile %8,4 (76), IFAT ile İç Anadolu’da %26, Doğu Anadolu’da %22,7 ve Güneydoğu Anadolu’da %43,8, CFT ile İç Anadolu’da %29, Doğu Anadolu’da %19,3 ve Güneydoğu Anadolu’da %31,4 bulunmuştur (84). cELISA ile Adana yöresinde yapılan araştırmada *T. equi*’nin seroprevalansı %56,8 olarak saptanmıştır (8). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise Türkiye genelinde CFT ile %16,55 (77), cELISA ile %16,21 (78), Karadeniz Bölgesinde IFAT ile %23,8 (79), Niğde ilinde IFAT ile %12,8 (80), Kars ve Ardahan yöresinde cELISA ile %19 (81), Adana ilinde cELISA ile %56,8 (82) olarak tespit edilmiştir.

Türkiye’de atlarda *T. equi*’nin moleküler prevalansı, ilk olarak Ankara’da gösteri ve spor atlarında PCR ile %7 bulunmuştur (12).

Deniz ve ark., 2005-2007 tarihleri arasında Türkiye’nin farklı coğrafik bölgelerinden (Adana, Ankara, Aydın, Bartın, Bitlis, Diyarbakır, Edirne, İstanbul, İzmir, Kilis, Konya, Malatya, Samsun, Şanlıurfa) seçilen illerde CFT (Komplement Fixation Test), IFAT (İndirekt Floresan Antikor Test) ve nested-PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile 300

adet at kan serumu ve EDTA'lı kan örneği muayenesi sonucunda testlere göre, mikroskopik bakıda %6,6; CFT testinde %34,6 (*T.equi* %33; *B. caballi* %0,3; %1,3 *T.equi* + *B.caballi*); IFAT testinde %61 (*T.equi* %34,3; *B.caballi* %10; %16,6 *T.equi* + *B.caballi*) ve PCR testinde %52 (*T.equi* %44,6; *B.caballi* %2,3; %5 *T.equi* + *B.caballi*) oranında pozitiflik tespit edilmiştir (83), (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Türkiye’de atlarda *B. caballi* ve *T. equi*’nin prevalansına yönelik yapılan çalışmalar (1997-2012).

Yerleşim Merkezi	İncelen Örnek Sayısı	Literatür No	Hastalık etkenine göre prevalans (%)		Teşhis Yöntemi
			<i>B. caballi</i>	<i>T. equi</i>	
Gemlik Askeri Harası	133	18	6,0	12,0	PKF
Malatya	130	71	3,0	11,5	PKF
Kayseri	89	70	7,9	4,5	PKF
Türkiye’nin Doğu Sınırı	110	72	(-)	58,2	PKF
			4,5	64,5	IFAT
Marmara	105	31	13,3	3,8	IFAT
			1,0	4,8	CFT
Ege	100	31	7,0	42	IFAT
			(-)	30	CFT
Akdeniz	85	31	15,3	23,5	IFAT
			1,2	11,8	CFT
İç Anadolu	100	31	10,0	26	IFAT
			1,0	29	CFT
Karadeniz	83	31	9,6	15,7	IFAT
			(-)	8,4	CFT
Doğu Anadolu	88	31	3,4	22,7	IFAT
			(-)	19,3	CFT

Tablo 2.4. Türkiye’de atlarda *B. caballi* ve *T. equi*’nin prevalansına yönelik yapılan çalışmalar (1997-2012). (devamı)

Yerleşim Merkezi	İncelen Örnek Sayısı	Literatür No	Hastalık etkenine göre prevalans (%)		Teşhis Yöntemi
Güneydoğu Anadolu	105	31	18,1	43,8	IFAT
			2,9	31,4	CFT
Marmara	205	73	(-)	(-)	PKF
			0-20,7	0-33,3	IFAT
			0-20,7	0-33,3	CFT
Ege	205	73	0,5	0,5	PKF
			0-33,3	0-100	IFAT
			(-)	0-43,5	CFT
Malatya	90-78	75	(-)	(-)	PKF
			2,5	20,5	IFAT
			(-)	18,0	CFT
Elazığ	90-78	75	(-)	(-)	PKF
			(-)	(-)	IFAT
			(-)	(-)	CFT
Karadeniz	83	76	(-)	(-)	PKF
			0-20,7	0-12,5	IFAT
			(-)	0-12,1	CFT
Akdeniz	85	76	(-)	(-)	PKF
			0-30	12,7-44,4	IFAT
			0-1,8	5-12,7	CFT
Kars	108	74	-	25	IFAT
Kars-Ardahan	273	81	29,3	19	ELISA
Adana	220	82	(-)	56,8	ELISA
Ankara	200	12	3,0	7,0	PCR

Tablo 2.4. Türkiye’de atlarda *B. caballi* ve *T. equi*’nin prevalansına yönelik yapılan çalışmalar (1997-2012). (devamı)

Yerleşim Merkezi	İncelen Örnek Sayısı	Literatür No	Hastalık etkenine göre prevalans (%)		Teşhis Yöntemi
Karadeniz	84	79	(-)	(-)	PKF
			38	23,8	IFAT
Niğde	125	80	9,6	12,8	IFAT
Farklı yöreler	300	83	0,3	33	CFT
			10	34,3	IFAT
			2,3	44,6	PCR
Farklı yöreler	4470	77	0,6	16,55	CFT
Farklı yöreler	481	78	1,46	16,2	ELISA

PKF: Periferik Kan Frotisi

IFAT: Indirect Fluoresan Antikor Test

CFT: Complement Fikzasyon Test

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

PCR: Polymerase Chain Reaction

2.6. PATOGENEZ

Genel olarak, atlarda piroplasmosis olguları akut, subakut ve kronik seyir gösterebilmektedir. Patogenezisde; yaş direnci, enfeksiyon sonrası şekillenen bağışıklık, stres faktörleri, aynı türün farklı suşları arasında oluşan çapraz bağışıklık durumu, parazitin virulansı ve miktarı, enfeksiyonun miks olup olmaması gibi faktörler etkilidir (22).

Piroplasmosis’in patogenezisinde damarlarda olan değişiklikler ve intravasküler hemolizler oldukça önemlidir. Akut dönemde meydana gelen plazma bileşiklerindeki değişiklik sonucu kılcal damarlarda tıkanmalar, pıhtılaşma bozuklukları, ödem, kanamalar, dokuların oksijensiz kalması, nekrozlar, şok ve ölüm görülebilmektedir (21, 22, 28). Ayrıca metabolik stresin etkisiyle eritrositlerde duvarın zayıflaması sonucu parçalanmalar meydana gelebilmektedir (6). Eritrositlerin parçalanması sonucu

eritrositler, nötrofil ve makrofajlar tarafından fagosite edilmekte ve ayrıca hayvanlarda anemi, hemoglobinüri, sarılık, kardiyak şok ve ölüm görülebilmektedir (48).

B. caballi enfeksiyonlarında prepatent süre 7-12 gün olup, bu enfeksiyonda kallikrein düzeyi artarken, kininojen seviyesi azalmaktadır. Ayrıca eritrositer parazitemi de %2 oranına ulaşmaktadır (17, 28).

T. equi enfeksiyonlarında ise prepatent süre 12-15 gün olup, eritrositer parazitemi %20'lere ulaşır, hatta 7. gününde %60-85 dolaylarında parazitemi olguları da bildirilmiştir (3,7).

T. equi'nin *B. caballi*'ye göre çok daha patojen olduğu, çünkü *T. equi* enfeksiyonlarında kan tablosunun daha şiddetli bozulduğu ve bu tablonun normale dönmesinin *B. caballi*'den daha uzun sürdüğü belirtilmiştir (10, 85).

2.7. KLİNİK SEMPTOMLAR

Tektırnaklı piroplasmosis'inde klinik belirtiler değişken olup spesifik değildir. Yalnızca klinik belirtilerle *T. equi* ve *B. caballi* enfeksiyonlarını ayırt edebilmek mümkün değildir. Ayrıca miks enfeksiyonlarda görülebilmektedir (2). Genel olarak, atlarda piroplasmosis özellikle yüksek ateş, anemi, sarılık ve hemoglobinüri ile seyretmektedir. Akut vakalar daha fazla görülmektedir. Genellikle 5-21 günlük bir inkübasyon periyodundan sonra ortaya çıkan hastalığın perakut safhasında meydana gelen klinik semptomlar, nadir olarak görülebilmekte ve hastalar çoğunlukla 1-2 gün içinde ölü halde bulunabilmektedirler (6). Akut vakalarda, 40 °C'yi aşan ateş ve sarılık en karakteristik semptomdur (Şekil 2.5). Bunun yanında; iştah kaybı, solunum ve nabız sayısında artış, mukoz membranlarda konjesyon görülmektedir. Ayrıca bu semptomlara ilave olarak, gözyaşı akıntısı ve göz kapaklarında yangı görülür. Lenf yumruları büyümüştür. Hayvan hızla kondüsyondan kaybeder.



Şekil 2.5. Yeni doğan tayda, doğumdan sonraki 10. saatte sklera ve konjunktivada sarılık
(Kaynak: Georges ve ark, 2011: 86.)

Subakut vakalarda da belirtiler benzer şekilde olmakla birlikte bu safhada; ağırlık kaybı, aralıklı ateş, değişik derecelerde sarılık ve bilirubinüri de gözlenebilmektedir. Müköz membranlar solgun pembe ya da açık sarı renktedir. Ayrıca söz konusu membranlarda peteşi ve ekimozların yanı sıra hayvanın bağırsak hareketlerinde azalma, hafif sancı ve bazen de bacakların alt kısmında ödematöz bir şişkinlik görülebilmektedir (28, 87- 89). Kronik olgular ise çoğunlukla spesifik değildir. İştahsızlık, halsizlik, zayıflama ve rektal muayenede dalağın büyümesi gibi atipik semptomlar görülebilmektedir. İntrauterin enfeksiyona yakalanmış taylar zayıf doğmakta ve hızla anemi ve sarılık semptomları göstermektedirler. Piroplasmosis’de sekonder olarak şekillenen komplikasyonlar sonucu akut renal yetmezlik, kolik, enteritis, laminitis, pneumoni, infertilite ve abort gibi bozukluklar ortaya çıkabilmektedir (6, 90).

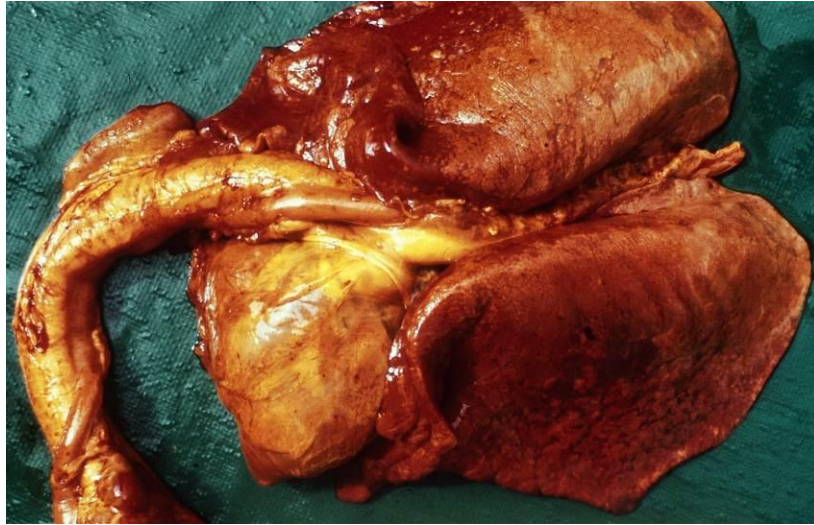
Etkeni *B. caballi* olan piropasmosis olgularında lokomotor sistemde bozukluklar ve posterior paraliz gözlenirken *T. equi*’nin neden olduğu hastalık olgularında bu semptomlar görülmemektedir. Bunun yanında *B. caballi*’de mortalite oranı %10 iken, *T. equi*’de bu oran daha fazla olmaktadır (23, 91).

Yapılan bir çalışmada, piroplasmosisli hasta ve taşıyıcılarda, lökosit sayısının arttığı, hemoglobin miktarında, eritrosit sayısında ve hematokrit, serum total protein miktarında düşme, buna karşın bilirubin miktarında ve karaciğer enzimlerinde (ALP, AST, GGT, CPK) genel bir yükselmenin olduğu saptanmıştır (89).

Diğer yandan Doğu Anadolu'nun sınır bölgelerinde at ve katırlarda subklinik piroplasmosis araştırması yapılmış ve *T. equi* ve *B. caballi* pozitif 58 tektırnaklıda bazı anti-oksidanların seviyesinde değişiklikler araştırılmış ve nitrik oksit seviyesinde artış saptanmıştır (92).

2.8. NEKROPSİ BULGULARI

Piroplasmosis olgusu görülen atların nekropsisinde genel olarak; göğüs ve karın boşluğunda sarımsı bir eksudat, dalak, karaciğer ve kalpte büyüme, ayrıca kalbin solgun renkte ve şişmiş et kıvamında olduğu, akciğerlerin ödemli, mukoza ve derialtı dokusunda ise yaygın sarılık ve kanama tablosu ile birlikte jelatinimsi infiltrasyonların görülebildiği bildirilmiştir (93, 94), (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Piroplasmosis'li bir atın nekropsisi sonucu görülen solgun renkli kalp ve konjesyonlu akciğer.

(Kaynak: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease-images.php?name=equine-piroplasmosis&lang=en>)

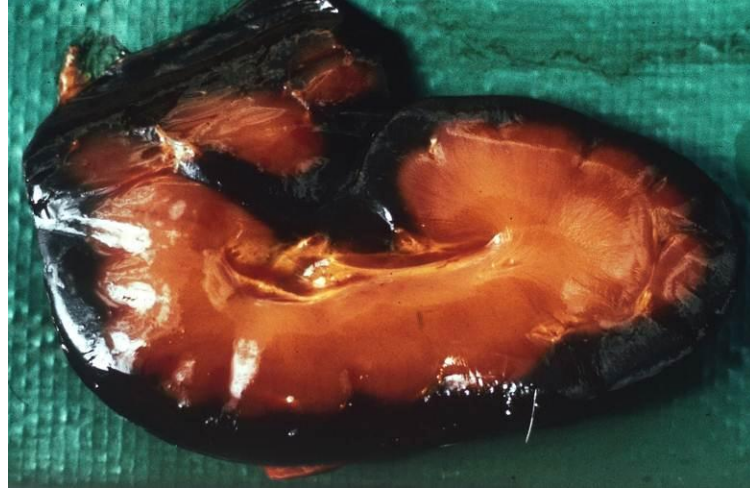
Akut vakalarda elde edilen nekropsi bulgularında genellikle; kaşeksi, anemi ve sarılık tablosunun görüldüğü, karaciğerin büyümüş, koyu portakal rengi ya da kahverenginde olduğu, dalağın büyüdüğü, böbreklerin ise solgun ve gevşek kıvamda olduğu, ayrıca böbreklerde peteşiyel kanamalar, kalpte subepikardiyal ve subendokardiyal kanamalar ile akciğerlerde pneumonie tablosu ve akciğer ödemi görülebildiği bildirilmiştir (10, 35,

90), (Şekil 2.7, 2.8). Bunun yanında, lenf nodüllerinde eritrofagositosizun görülmesi ise dikkat çekici bir başka bulgu olarak kaydedilmiştir (7).



Şekil 2.7. Piroplasmosis'li bir atın nekropsisinde görülen yaygın ikterus

(Kaynak: <http://www.vetnext.com/search.php?s=aandoening&id=73060442801%20469>)



Şekil 2.8. Piroplasmosis'li atın böbreğinde görülen ikterus

(Kaynak: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease-images.php?name=equine-piroplasmosis&lang=en>)

Piroplasmosisli atların karaciğeri üzerinde yapılan bir çalışmada, karaciğerde ağır sentrilobular dejenerasyon ve koagulatif tipte nekrozlar görüldüğü, birbirine komşu olan nekrozlaşmış ve tamamı şişmiş vaziyette olan hepatositlerin sitoplazmalarının granüler yapıda olduğu, özellikle orta ve giriş kısımlarında yağ damlacıkları ve nadiren safra pigmentlerinin görüldüğü, dejenere hepatositlerin etrafında polimorfnükleer hücre infiltrasyonu olduğu, eosinofillerin koyu bir renk aldığı (hyalin damlacıkları), şekli ve

boyutlarının değişmiş olduğu, ayrıca safra kanallarında hiperplazi ve tıkanma görüldüğü bildirilmiştir (89).

2.9. BAğIşIKLIK

Piroplasmosis'e karşı immunitede, hem sıvısal (humoral) ve hem de hücresele (cellular) faktörler görev alırlar. Parazite konaklık yapan bütün memelilerde, ya enfeksiyona maruz kalıp iyileştikten ya da profilaktik bir immunizasyondan sonra (aşılama gibi) piroplasmosis'e neden olan türlere karşı immuniteler gelişebilir (95). Başlangıçta immün sistem, etkili bir "primed" (güçlü immün aktivasyon) kazanır (96). Enfeksiyon konağa bulaştırıldığında sporozoitler, kısa bir müddet dolaşımda plazma içerisinde serbesttirler. Bu aşamada immunglobulin G (IgG), sporozoitlerin hedef hücrelere girmesinden önce onlara bağlanıp nötrale ederek enfeksiyonu engelleyebilir.

B. caballi'de sporozoitler eritrositlere girdikten sonra parazitemi yükselir ve akut piroplasmosis görülebilir. Doğal immün sistem hücreleri, parazitin gelişme hızını kontrol ederek paraziteminin süresini belirler. Makrofajların ve Natural Killer (NK) hücrelerin yokluğunda, kısa süre içerisinde yüksek bir parazitemi gelişir. Paraziteminin engellenmesi, çözünebilir faktörlerin üretimiyle gerçekleşir. Bu faktörler; NK hücreler tarafından salınan IFN- γ ve makrofajlar tarafından üretilen TNF- α , NO ve reaktif oksijen türleri (ROSS)'dir. Parazitemideki düşme, parazitlerin dejenerasyonu ve bunların dalak tarafından temizlenmesi ile sağlanır. Bu sırada enfeksiyon çözölme evresine girer ve hastalık şiddetliden sakin döneme geçer. Hastalığın gerileme evresinde, parazitlerin ölümü için T lenfositleri, özellikle de CD4+ (Cluster Designation 4+) ve IFN- γ subpopulasyonları gereklidir (95).

T. equi enfeksiyonlarında, enfeksiyona karşı oluşan immün yanıtta parazitin dozu ve virulensi etkili olmaktadır. Özellikle duyarlı atlardaki yüksek dozdeki sporozoit enfeksiyonu akut, ölümcül bir hastalık tablosu oluşurmaktadır. Enfeksiyona yakalanan hayvanlar, parazitin farklı yaşam dönemlerine ait farklı antijenik determinantlarla karşılaşmakta ve bağışıklığın oluşmasında hem humoral hem hücresele immün sistem etkili olmaktadır (97-99). Aynı zamanda sitotoksik T hücreleri, NK hücreleri, makrofajlar ve yardımcı T hücreleri de bu yanıtta rol oynamaktadır.

Piroplasmosis'li atlarda meydana gelen premünisyonun iki yıl kadar devam ettiği kaydedilmiştir (10). Bu hayvanlar, premünisyon döneminde, kanlarında bir miktar parazit taşımakta ve dolayısıyla keneler aracılığıyla enfeksiyonun yayılmasına hizmet

eden portör görevi görmektedirler. Söz konusu kan parazitlerinin, çeşitli türleri arasında çarpaz immunitenin olmadığı saptanmıştır (100). Parazitlerin organizmadan tamamen yok olmasıyla piremünisyon da kaybolmakta ve hayvan ilk enfeksiyona sebep olan aynı tür etkenlere karşı yine hassas hale gelmektedir. Piroplasma enfeksiyonlarının genelde gençlere oranla erişkinlerde, yerli ırklara göre yabancı ırklarda daha şiddetli seyrettiği görülmüştür (10). Maternal antikörlerin doğumdan itibaren 1-4. aylarda koruyucu olduğu saptanmıştır (20).

2.10. TEŞHİS

Piroplasmosis'in teşhisinde klinik belirtiler önemli derecede yol gösterici olmakla birlikte bu semptomlar, surra, atların enfeksiyöz anemisi, dourine, Afrika at vebası, leptospirosis, trypanosomiasis, purpura hemorajika, monositik ehrlichiosis, karaciğer hastalıkları, çeşitli bitkilerle ve kimyasallarla zehirlenmelerle karıştırılabilmektedir (6, 24, 28). Bu nedenle teşhis sadece klinik semptomlar dikkate alınarak yapılmamalı, kan frotilerinin mikroskopik muayenesi, Komplement Fiksasyon Testi (CFT), Indirect Fluoresan Antikör Testi (IFAT), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gibi serolojik testler ile Polimeraz Chain Reaction (PCR) ve Real Time PCR (qPCR) gibi moleküler yöntemler mutlaka kesin teşhis için kullanılmalıdır.

2.10.1. Mikroskopik Muayene ile Teşhis

Mikroskopik muayene perifer kandan, lenf yumurusu punksiyonundan ya da nekropsi sonrası organlardan hazırlanan frotilerin Giemsa boyası ile boyanması sonucu yapılmaktadır. Hastalığın akut döneminde, etkenlerin eritrositer formlarını görmek için kullanılan bu teşhis metodu, çabuk sonuç veren bir yöntem olarak bilinmektedir (12, 24, 101). Kene tutmasından 12-24 gün sonra lenf düğümlerine punksiyon yapılarak elde edilen lenfositlerin mikroskopik muayene yöntemi incelenmesi sonucu, hazırlanan preparatlarda *T. equi*'nin çok net bir şekilde görüldüğü bildirilmiştir (102).

Teşhisin hızlı bir şekilde yapılmasına olanak sağlayan bu yöntem, paraziteminin düşük olduğu dönemde, etkenin her zaman tespitine olanak sağlamaması nedeniyle güvenilir değildir. Ayrıca bu yöntem ile doğru teşhis konulabilmesi için mutlaka deneyimli bir personelin bulunması gerekmektedir.

2.10.2. Serolojik Yöntemler ile Teşhis

Serolojik testlerden ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), CFT (Complement Fikzasyon Test), IFAT (Indirect Fluoresan Antikor Test), LAT (Lateks Aglutinasyon Test), WB (Western Blot Analiz) ve ICT (Immunochromomatographic Test) yöntemleri kullanılmaktadır. (29, 51, 103, 104).

The World Organisation for Animal Health (OIE) standartlarına göre tek tırnaklı piroplasmosisin teşhisinde serolojik olarak CFT ve IFAT birlikte kullanıldığı belirtilmektedir (44, 49, 105). Uluslararası at nakillerinde genellikle CFT serolojik yöntemi kullanılmaktadır. Ancak latent enfeksiyonlarda ve hastalığın başlangıç döneminde bu yöntemin spesifitesi düşük olup sonuçlar güvenilir olmamaktadır (87, 106). Ayrıca söz konusu testte antikor seviyelerinin tam olarak belirlenememesi ve çapraz reaksiyonların şekillenmesi gibi problemler de görülebilmektedir (107). IFAT yöntemi de CFT gibi uluslararası ticarete kabul edilen serolojik yöntemlerden biri olmakla birlikte bu yöntem daha çok şüpheli durumlarda *T. equi* ve *B. caballi* enfeksiyonlarının ayırıcı teşhisinde kullanılmaktadır. ELISA yönteminin IFAT ve CFT yöntemine göre daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu bildirilmesine rağmen bu yöntemde *T. equi* ve *B. caballi* arasında çapraz reaksiyonlar meydana gelmekte ve testin güvenilirliği azalmaktadır (8, 87, 106).

B. caballi ve *T. equi* ile yapılan deneysel enfeksiyonlardan sonraki 2-13. günler arasında hazırlanan kan frotilerinde etkenlerin saptanmış ve çalışmada antikorların tespitinde ELISA, IFAT ve CFT kullanılmıştır. CFT ile tespit edilen antikorlar, *B. caballi* ile enfekte atların enfeksiyonundan 2-3 ay sonra azalırken, latent enfeksiyonlar esnasında IFAT ve ELISA'nın pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir. IFAT'daki antikor titresi CFT'ye göre daha yüksek bulunmuş, ilerleyen zamanda CFT ile negatif sonuç verenlerin IFAT ile hala pozitif olduğu görülmüştür. *T. equi* antikorlarının *B. caballi* antikorlarına göre CFT ve IFAT ile daha uzun süre yüksek titrede kaldığı tespit edilmiştir (5).

Bir başka çalışmada, deneysel enfekte edilmiş atlarda yapılan serolojik testler ELISA'nın duyarlılığı %100, IFAT'ın %98 ve CFT'nin %47 olarak bulunmuş. Ayrıca çalışmadaki sonuçlar, Western Blot yöntemi kullanılarak da teyit edilmiştir (20).

Serolojik yöntemlerle yapılan testler ucuz ve uygulanabilirliği kolay olmasına rağmen, hastalığın çok erken veya latent döneminde test duyarlılıklarının düşük olması ve çapraz reaksiyonlara bağlı yanlış sonuçlar elde edilebilmesi sebebiyle, söz konusu testler güvenilirliğini yitirmektedir. Bu nedenle özellikle portör hayvanların belirlenmesinde moleküler tabanlı biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır.

2.10.3. Immunochromatographic Test (ICT) ile Teşhis

Son zamanlarda Japonya’da immunochromatographic test (ICT) adı verilen hızlı ve basit bir strip serodiyagnostik test geliştirilmiştir. Uzman olmayan kişilerin dahi kolaylıkla kullanabileceği bu test, nitroselüloz membran tabanlı olup, membran üzerine *T. equi* (EMA-2t) ve *B. caballi* (Bc48)’ye ait rekombinant proteinler emdirilmiştir. Bu membran üzerine bir damla kan (antikor) damlatılarak hastalığın teşhisi kolaylıkla yapılabilmektedir (108).

2.10.4. Moleküler Yöntemler ile Teşhis

Hastalık etkenlerinin teşhisinde gerek mikroskopik gerekse serolojik yöntemlerde karşılaşılan olumsuzluklar nedeniyle son zamanlarda moleküler tabanlı teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknikler ile özellikle taşıyıcı hayvanlarda piroplasma türlerini de içine alan birçok patojen etkeni, duyarlı ve özgül bir şekilde teşhis edilebilmektedir (13, 87, 103, 109, 110).

Moleküler tabanlı tekniklerden olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile kanda %0.000083 oranındaki paraziteminin saptanabilmesi (87, 103), latent enfeksiyonların tanısında, ithal edilecek atların portörlük bakımından kontrolünde, yarış veya gösteri atlarının düşük performans durumlarında, piroplasmosis’in araştırılmasında, değerlendirilmesinde ve tedavi etkinliğinin belirlenmesinde PCR’ın önemli bir tanı yöntemi olduğunu göstermektedir (110). Piroplasmosis’in teşhisinde moleküler tabanlı tekniklerin kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur. Bashiruddin et al. (87), *B. caballi* ve *T. equi*’nin 16S-rRNA gen bölgesini saptayan farklı primer setlerini atlarda piroplasmosisin moleküler teşhisi ve karakterizasyonunda kullanmışlardır. Bunun yanında Güçlü ve Karaer (12), Ankara yöresinde sportif ve gösteri amaçlı yetiştirilen atlardan toplanan kanlarda *B. caballi* ve *T. equi*’nin teşhisinde PCR tekniğini kullanmışlar, *B. caballi* için RAP-1, *T. equi* için ise EMA-1 hedef gen bölgesini kullanmışlardır. Nicolaiewsky et al. (103) ile Rampersad et al. (110), *B. caballi* ve *T. equi*’nin teşhisinde nested PCR’ı uygulamışlardır. Deniz ve ark. (83), 2005-2007

tarihleri arasında Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden (Adana, Ankara, Aydın, Bartın, Bitlis, Diyarbakır, Edirne, İstanbul, İzmir, Kilis, Konya, Malatya, Samsun, Şanlıurfa) seçilen illerdeki atlardan toplanan 300 kan serumundan *B. caballi* ve *T. equi* türlerinin tanısını yapmak amacıyla nested-PCR tekniğini kullanmışlardır. Son yıllarda atlarda etkenlerin eş zamanlı tespitinde multiplex PCR (111) geliştirilmiştir. Alhassan ve ark. (111), *B. caballi* ve *T. equi*'nin eş zamanlı teşhisinde 18S ribozomal RNA genlerini hedefleyen multiplex PCR kullanmışlar ve bu yöntemin söz konusu enfeksiyonlara yönelik epidemiyolojik çalışmalarda ve rutin laboratuvar teşhislerinde basit ve güvenilir bir yöntem olduğunu kaydetmişlerdir.

Moleküler tabanlı yöntemlerden olan real-time PCR, piroplasmosis enfeksiyonlarının teşhisinde 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. Bu amaçla Posnett and Ambrosio (109), *B.caballi*'nin saptanmasında spesifik DNA problemlerini kullanmışlardır. Heim et al. (57) Brezilya'da atlarda etkenlerin tespitinde ve izolatların belirlenmesinde ilk defa multiplex real time PCR (MRT-PCR) yöntemini kullanmışlardır. Bunu takiben Moğolistan'da Rüegg et al. (112), farklı primer setleriyle yine MRT-PCR yöntemini kullanarak atlarda piroplasmosisi araştırmışlardır. Kim ve ark., Gana ve Brezilya'dan topladıkları at kanlarında *T. equi* etkenlerini araştırmak için real time PCR tekniği kullanmışlardır (113). Güney Afrika'da 41 at üzerinde yürütülen bir çalışmada, equine piroplasmosis'i saptamak amacıyla real time PCR kullanılmıştır (60). Bunu takiben Dubai'de yapılan bir çalışmada, 105 at serumu örneğinde serolojik yöntemlerin yanında real time PCR yöntemi de kullanılarak piroplasma etkenleri araştırılmıştır (61).

Real-time PCR, son yıllarda konvensiyonel PCR ve nested PCR'ın yerini almaya başlamıştır. Real-time PCR, bu yöntemlere göre daha duyarlı ve spesifik olup daha kesin sonuç vermesi ve tekrarlanabilir olması nedeniyle tercih edilmektedir (114). Real time PCR ile DNA miktarı net olarak ölçülebilmekte ve parazitemi bu şekilde moniterize edilebilmektedir (115).

2.11. TEDAVİ

Tektırnaklıların tedavisinde, hastalığın erken dönemlerinde yapılacak müdahale oldukça önemlidir. Tek tırnaklı hayvanların tedavisinde genellikle imidocarb grubu ilaçlar kullanılmaktadır (116). Bunun yanında son yıllarda piroplasmosis'li atlar üzerinde yapılan bir çalışmada diminazene diaceturate'ın %80 diminazene aceturate ise %90 oranında tedavide etkili olduğu bildirilmiştir (117). Ayrıca Parvaquon ve Buparvaquon gibi antitheilerial ilaçlar etkeni *T. equi* olan piroplasmosis enfeksiyonlarda etkili bulunmuş, fakat 4 hafta sonra hastalık tekrarlanmıştır. Bu bulgular, antitheilerial ilaçların *T. equi*'nin lenfositlerdeki şizont gelişimine etkili olduğunu fakat hastalığın ilerlediği durumlarda yetersiz kaldığını göstermektedir (118, 119).

Öte yandan, hasta hayvanlar dengeli beslenmeli ileri derecede anemi durumunda kan nakli yapılmalı ayrıca glukoz ve fosfolipitler verilmeli, anoreksi ve ishal durumunda sıvı sağaltımı yapılmalıdır. (7).

2.12. KORUNMA

Piroplasma enfeksiyonlarının şekillenmesinde vektör keneler, hasta hayvanlar ve belirti göstermeyip hastalığın yayılmasında önemli olan (portör) atlar büyük rol oynamaktadır. Korunmada, kene kontrolü çok önemlidir (7). Kenelerin çok sayıda ve aktif olarak bulundukları alanlarda ve barınaklarda kenelerle mücadeleye önem verilmelidir. Brezilya'da yapılan bir çalışmada, kene mücadelesinin yapılmadığı çiftliklerde seropozitif hayvan yüzdesinin yüksek olduğu, fakat bu oranların uygun kene mücadelesinden sonra büyük oranda düştüğü belirtilmiştir (58).

Öte yandan, özellikle endemik alanlardan at ithallerinde, subklinik ya da kronik enfeksiyonların belirlenmesine yönelik serolojik ve moleküler yoklamaların yapılması, piroplasmosis için potansiyel taşıyıcı olan atların tespit edilmesi hastalığın kontrolünde önem taşımaktadır.

Amerika'nın Florida Eyaletinde yapılan çalışmalar sonucu, endemik bölgelerdeki atlar da dahil olmak üzere tüm atlar piroplasmosis etkenlerinin varlığı yönünden parazitolojik ve serolojik (Surveylans) yöntemlerle taranmış, pozitif bulunanlar karantina altına alınarak, piroplasma etkenlerine karşı ilaçlarla tedavi uygulanmıştır. Bunun yanında vektör kene mücadelesi de yapılarak hastalık eradike edilmiştir (35).

Piroplasmosis ile mücadelede, cerrahi ve medikal uygulamalarda, enjeksiyon esnasında aynı enjektörün kullanılmasıyla hasta hayvanlara ait kanların sağlam hayvanlara bulaştırılması sonucu da enfeksiyonun şekillenebileceği mümkün olduğundan dolayı gerekli tedbirlerin alınması gerekmektedir (6, 20).

Günümüzde piroplasmosis'e karşı uygulanan ticari bir aşı mevcut değildir. Yapılan çalışmalarda, öldürülmüş *T. equi* merozoitlerinin immunojenik yeteneğinin olduğu bildirilmiştir (106).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. SAHA ÇALIŞMALARI

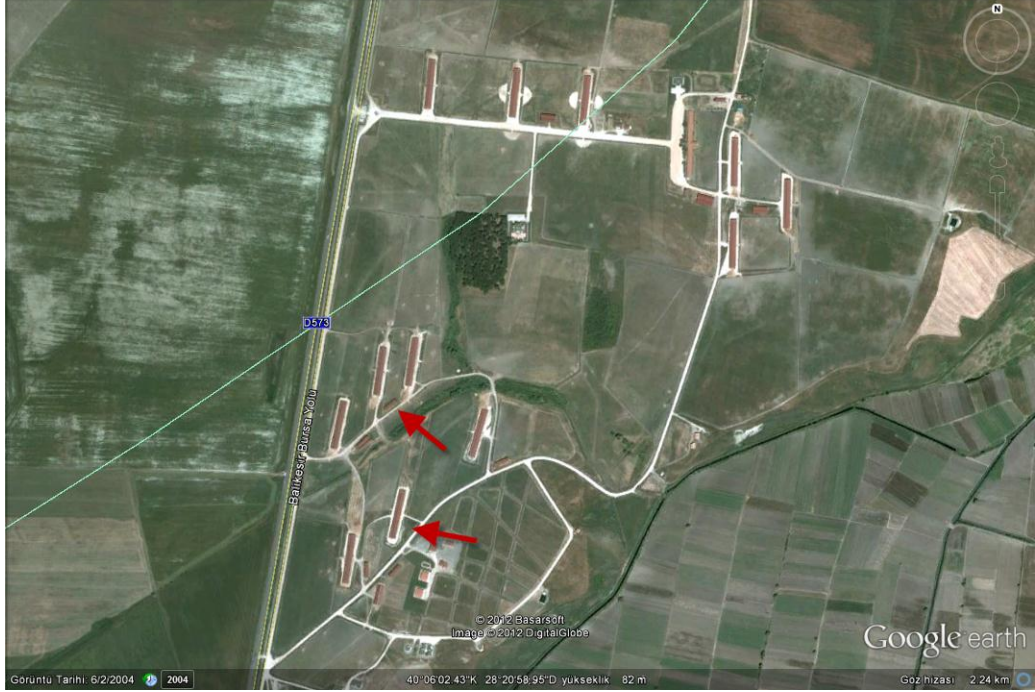
3.1.1. Araştırma Sahası

Çalışma, Mayıs – Temmuz 2009 tarihleri arasında Bursa Karacabey yöresindeki Karacabey Tarım İşletmesi Müdürlüğü'ne ait 3 ayrı tavladaki (Şekil 3.1) 153 ve aynı yöredeki Türkiye Jokey Kulübü Karacabey Pansiyon Harasında (Şekil 3.2) 50 olmak üzere toplam 203 at üzerinde yürütülmüştür.



Şekil 3.1. Karacabey Tarım İşletmesi Müdürlüğü'ne ait örneklemeye istasyonları

Örneklemeye alınan hayvanların örnekleme merkezi, yaş, cinsiyet ve ırka göre dağılımları Tablo 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.2. Türkiye Jokey Kulübü’ne ait örnekleme istasyonları

Tablo 3.1. Bursa Karacabey yöresinde incelenen atların örnekleme merkezi yaş, ırk ve cinsiyete göre dağılımları

Örnekleme Merkezi	At Sayısı							
	Yaş (yıl)			İrk		Cinsiyet		Toplam
	0-3	4-6	>6	Arap	İngiliz	Erkek	Dişi	
Tarım İşletmesi Müdürlüğü	68	16	69	153	-	66	87	153
Türkiye Jokey Kulübü	-	15	35	-	50	-	50	50
Toplam	68	31	104	153	50	66	137	203

3.1.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Toplam 203 atın vena jugularis'inden tekniğine uygun olarak 5 ml'lik steril EDTA'lı (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate) tüplere kan örnekleri alınmış ve örnekler soğuk zincirde taşınarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirilmiştir. Laboratuara getirilen kan örneklerinin her birine protokol

numarası verilmiştir. Kan örnekleri analizleri yapılncaya kadar derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edilmiştir.

3.2. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI

3.2.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu

-80 °C'de muhafaza edilen kan örnekleri ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözünmeye bırakılmış ve çözünen örneklerden homojenizasyon sonrası genomik DNA ekstraksiyonu, tam otomatik DNA/RNA ekstraksiyon cihazında (Bioneer Exiprep™ 16) gerçekleştirilmiştir. Final elüsyon 50µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen genomik DNA konsantrasyonları moleküler analizlerde optimum DNA konsantrasyonunun ayarlanabilmesi için Nanodrop spektrofotometre (ACT Gene ASP-3700) kullanılarak ölçülmüştür. Genomik DNA ekstraktları kullanılabilecek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR)

Elde edilen genomik DNA ekstraktları *B. caballi* ve *T. equi*'nin parsiyel 18S rRNA (ribozomal RNA) gen bölgelerini hedef alan spesifik primerler ve TaqMan probolar kullanılarak Real Time PCR'da analiz edilmiştir. Bu amaçla kullanılan primer ve TaqMan proboları Tablo 3.2'de verilmiştir (60, 113). Bu tekniğin uygulanması ile örneklerde *B. caballi* ve *T. equi* varlığı eş zamanlı olarak incelenmiştir.

Tablo 3.2. *B. caballi* ve *T. equi* için Real Time PCR'da kullanılan primer ve TaqMan probolar

Primer Adı	Primer Dizilimi (5'---3')
<i>T. equi</i>	
Be18SF	5'-GCG GTG TTT CGG TGA TTC ATA-3'
Be18SR	5'-TGA TAG GTC AGA AAC TTG AAT GAT ACA TC-3'
Be18SP	FAM- 5'-AAA TTA GCG AAT CGC ATG GCT T-3'-BHQ1
<i>B. caballi</i>	
Bc-18SF402	5'-GTA ATT GGA ATG ATG GCG ACT TAA-3'
Bc_18SR496	5'-CGC TAT TGG AGC TGG AAT TAC C-3'
Bc_18SP	HEX-5'- CCT CGC CAG AGT AA -3'-BHQ2

Real Time PCR testinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının kontrolü amacıyla her qPCR analizinde pozitif kontrol yurt içi ve yurtdışından temin edilmiş *T. equi* ve *B. caballi* izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Real Time PCR analizleri Stratagene Mx 3005P (Stratagene, Agilent Technologies, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR, master mix üreticinin açıklamalarına göre toplam 20 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies)	10,0 µl
Be18SF (10 pmol)	1,0 µl
Be18SR (10 pmol)	1,0 µl
Be18SP (10 pmol)	1,0 µl
Bc-18SF402 (10 pmol)	1,0 µl
Bc_18SR496 (10 pmol)	1,0 µl
Bc_18SP (10 pmol)	1,0 µl
Genomik DNA (50 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	3,0 µl

Real Time PCR amplifikasyonu için termal profil 95 °C 10dk 1 siklus ve 45 siklus 95 °C 10sn, 56 °C 1dk olarak modifiye edilmiştir (60). Real Time PCR analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler ve kantitatif değerler, amplifikasyon eğrileri ve Ct (dR) (Eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

Real Time PCR analizlerinde uygulanan testlerin konfirmasyonu ve validasyonu amacıyla tüm örnekler ayrıca *B. caballi* Real Time PCR standart kiti (PrimerDesign Ltd, Genesig, İngiltere) ile üreticinin açıklamalarına göre analiz edilmiştir.

3.2.3. 18S rRNA Geninin Amplifikasyonu

Real Time PCR analizlerinde pozitif ve negatif bulunan tüm örnekler ait izolatlar, *Theileria*, *Babesia* ve *Hepatozoon* gibi apikompleksan protozoonların 18S rRNA geninin yaklaşık 500bp uzunluğunda kısmını amplifiye eden TB-F (5'-CTTCAGCACCTTGAGAGAAAT-3') ve TB-R (5'-TCDATCCCCRWCACGATGCR BAC-3') genel primerleri ile PCR analizine tabii tutulmuştur (120).

Reaksiyon karışımı 25µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 1 X PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 10 pmol her bir primer, 200 mM her bir dNTP, 0,5U Taq

DNA polymerase ve 50 ng/μl template DNA olarak hazırlanmıştır. Thermalcyclerlarda protokol initial denaturation: 94 °C'de 5 dk; 39 siklus, denaturation: 94 °C'de 45s, annealing: 62 °C'de 30s, extension: 72 °C'de 45sn; final extension: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (120). PCR analizlerinde herhangi bir kontaminasyonun meydana gelip gelmediğini belirlemek amacı ile steril deiyonize su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 μl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Upland, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.4. 18S rRNA Geninin Sekansı ve Filogenetik Analizi

PCR sonucu jel üzerinde belirlenen ampliconlar, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonrası örnekler, 18S rRNA parsiyel gen bölgesinin analizi PCR'da kullanılan TB-F ve TB-R primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlar ait kromatogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra BioEdit Sequence Alignment (121) ve Geneious 5.5.5 (122) yazılımları ile forward ve revers dizilimlerin pairwise alignmentları yapılmış final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra Dünyada GenBank'a kayıtlı diğer izolatlar ile Mega 5.0 (123) ve Geneious 5.5.5 (122) yazılımlarında multiple alignmentları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur. Elde edilen tüm dizilimlerin GenBank kayıtları yapılmıştır.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistik açıdan incelenen atlarda piroplasmosis prevalansı ile yaş, cinsiyet ve ırk faktörlerinin ilişkisi, Fisher's Exact ve Pearson's Chi Square testleriyle araştırılmıştır. *T. equi* ve *B. caballi* pozitif örneklerde DNA yoğunluğunu dolayısıyla parazitemiyi gösteren eşik değer sikluslarıyla (Ct(dR)) yaş ve cinsiyet faktörlerinin ilişkisi Independent Samples T testi, ırk faktörünün ilişkisi ise One-Way Anova testiyle araştırılmıştır. Atlarda piroplasmosis'in teşhisinde kullanılan Real Time PCR ve Konvansiyonel PCR yöntemlerin istatistiksel olarak sensitivite ve spesifiteleri ilgili referansa göre belirlenmiştir (124). Testler arasındaki uyumun belirlenmesinde Kappa testi kullanılmıştır. İstatistik hesaplamalar SPSS 15.0 programı kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. REAL TIME PCR SONUÇLARI

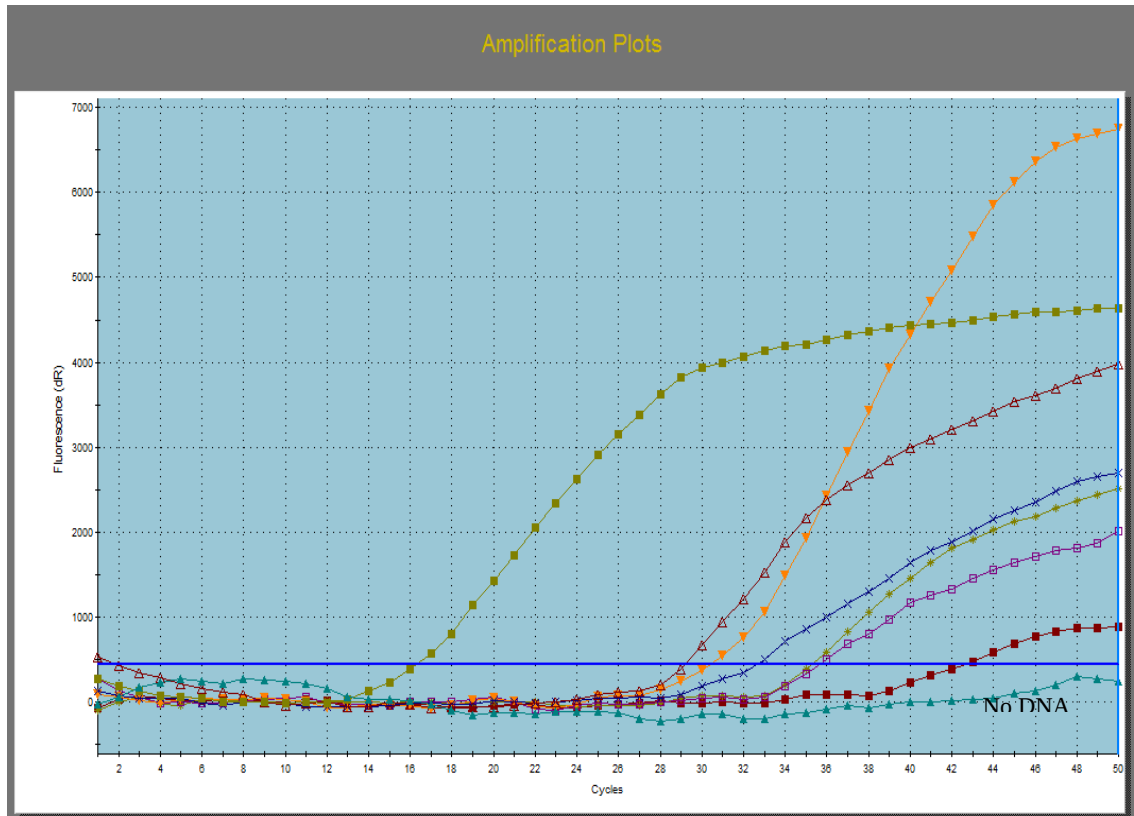
İncelemesi yapılan toplam 203 attan 10'u (%4,93) Real Time PCR analizleriyle piroplasmosis yönünden pozitif bulunmuştur. Pozitif belirlenen örneklerin merkezlere göre dağılımı Tablo 4.1'de verilmiştir. Tarım İşletmesi Müdürlüğünden örneklenen 153 atın 4'ünde *T. equi*, 3'ünde *B. caballi* pozitifliği belirlenirken Türkiye Jokey Kulübünden örneklenen 50 atın 2'sinde *T. equi*, 1'inde ise *B. caballi* pozitifliği tespit edilmiştir. Araştırma yöresinde *B. caballi* ve *T. equi*'nin, prevalansı sırasıyla %1,97 ve %2,96 olarak saptanmıştır. Pozitif belirlenen örneklerin TaqMan prob tabanlı Real Time PCR'da *T. equi*, ve *B. caballi*'nin 18S rRNA gen bölgesini amplifiye eden spesifik primer ve problarla analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri sırasıyla Şekil 4.1-4.3'de verilmiştir. Saptanan Ct (dR) (Eşik değer siklusu) değerleri *T. equi* için Şekil 4.4, *B. caballi* için de Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

Real Time PCR analizlerinin kontrolü amacıyla uygulanan *B. caballi* Real Time PCR standart kiti (PrimerDesign Ltd, Genesig, İngiltere) ile *T. equi* ve *B. caballi* pozitif belirlenen tüm örneklerin amplifikasyon gösterdiği saptanmıştır. Söz konusu kit ile elde edilen amplifikasyon eğrileri Şekil 4.6'de verilmiştir.

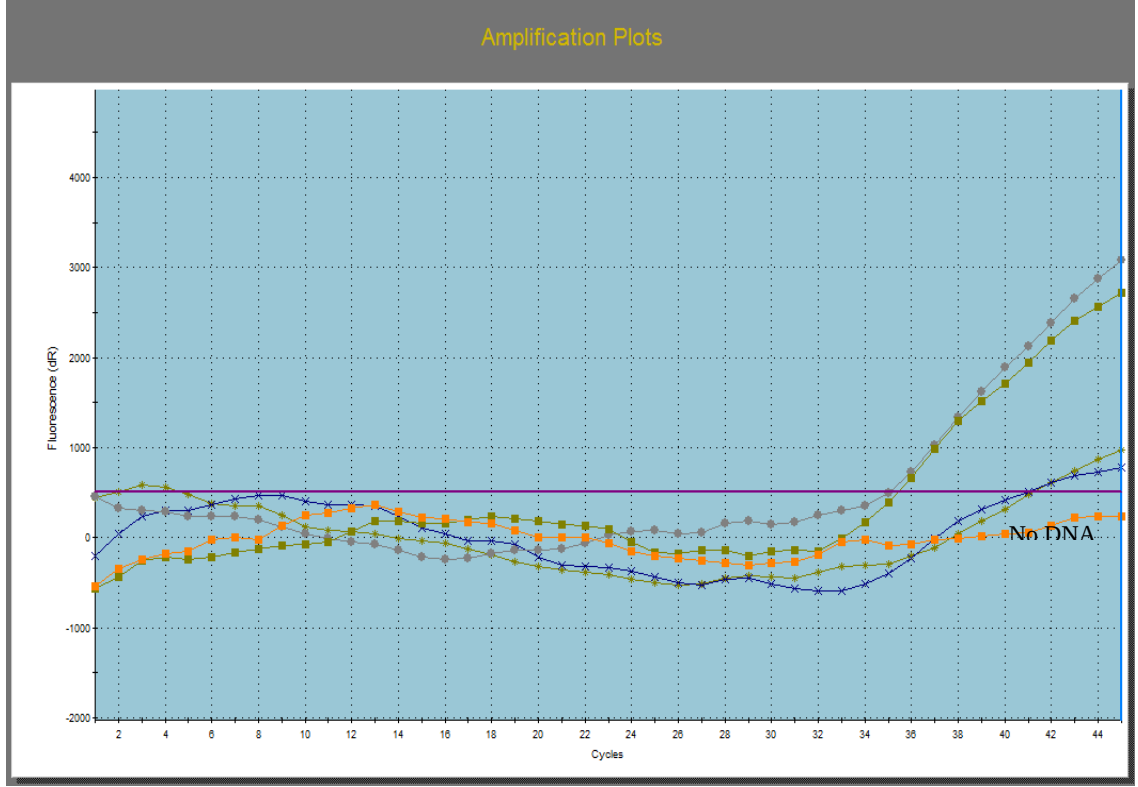
Tablo 4.1. Real Time PCR incelemesi yapılan atlarda piroplasmosis pozitifliğinin örnekleme merkezlerine göre dağılımı

Örnekleme Merkezi	Örnek Sayısı	Hastalık etkenine göre prevalans				Toplam Prevalans	
		<i>B. caballi</i>		<i>T. equi</i>			
		n	%	n	%	n	%
Tarım İşletmesi Müdürlüğü	153	3	1,96	4	2,61	7	4,57
Türkiye Jokey Kulübü	50	1	2,00	2	4,00	3	6,00
Toplam	203	4	1,97	6	2,96	10	4,93

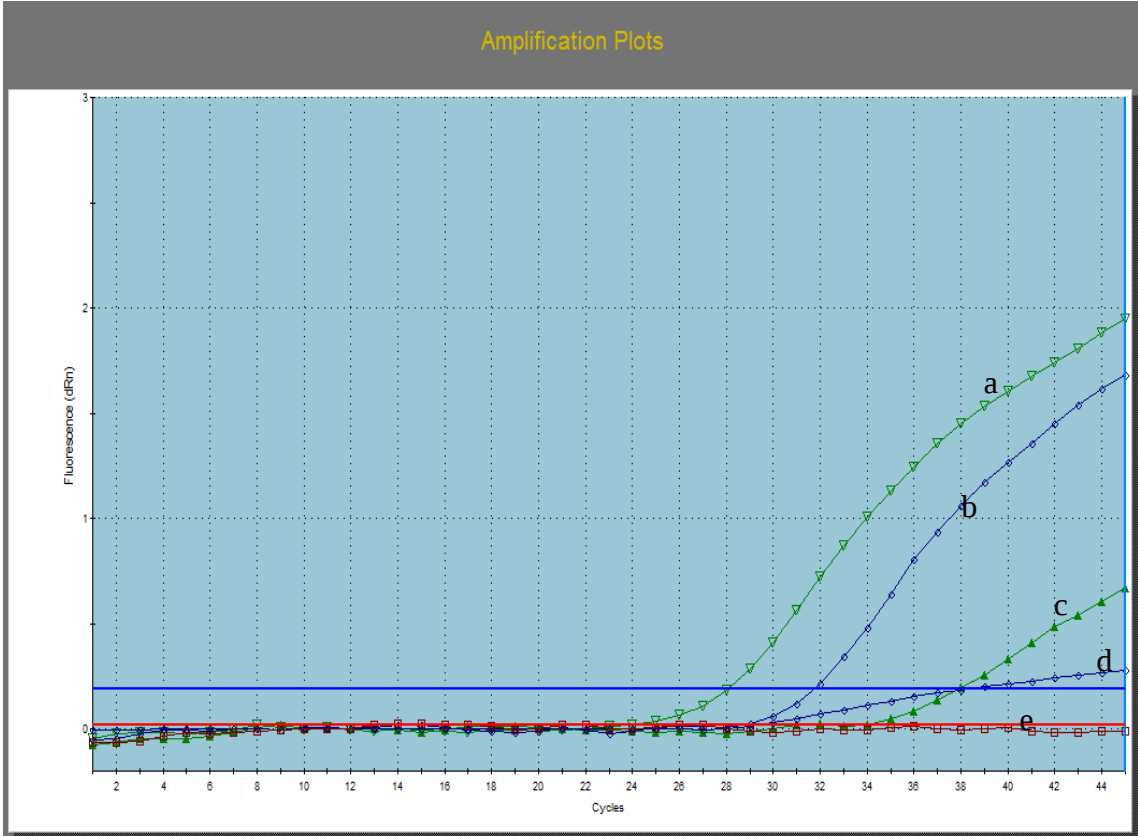
n: Pozitif hayvan sayısı



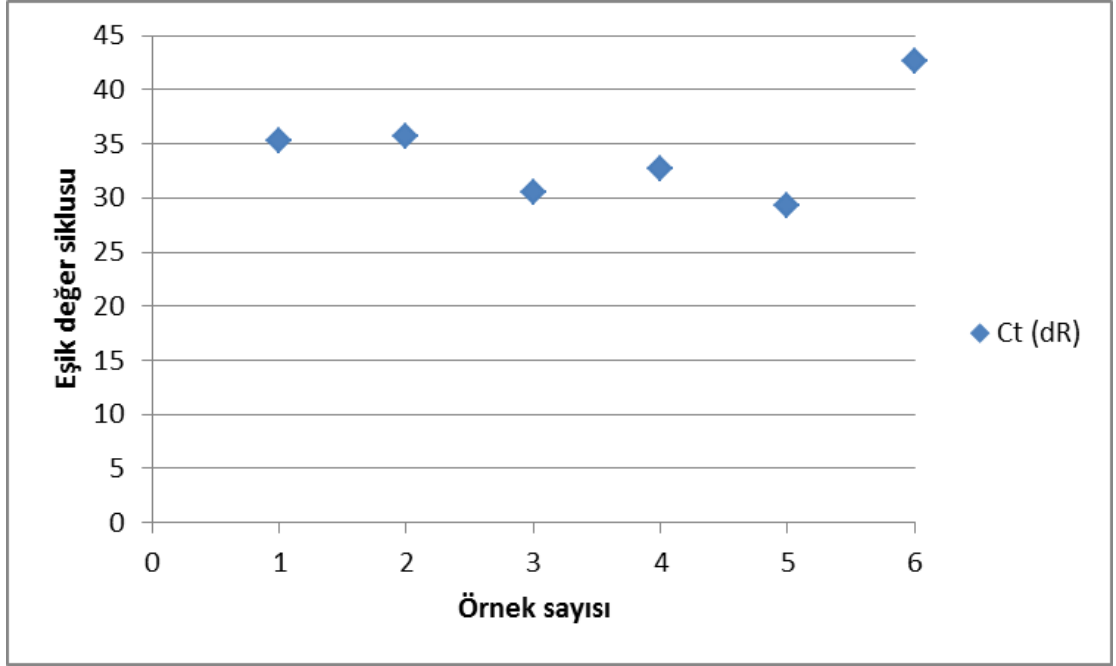
Şekil 4.1. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu *T. equi* pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon grafikleri



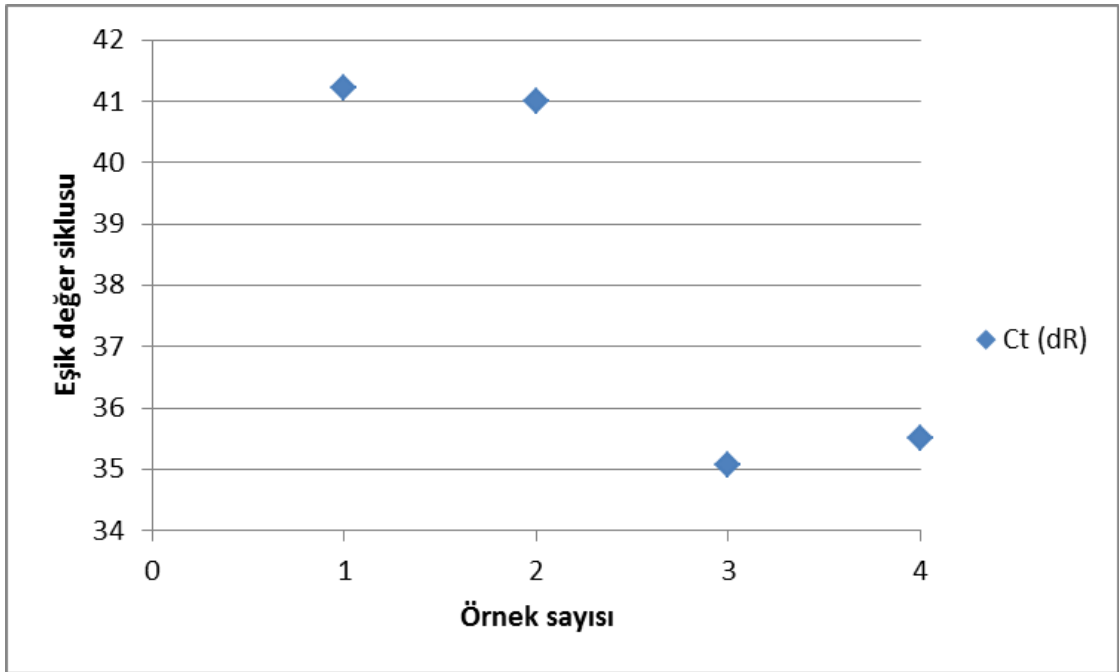
Şekil 4.2. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu *B. caballi* pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon grafikleri



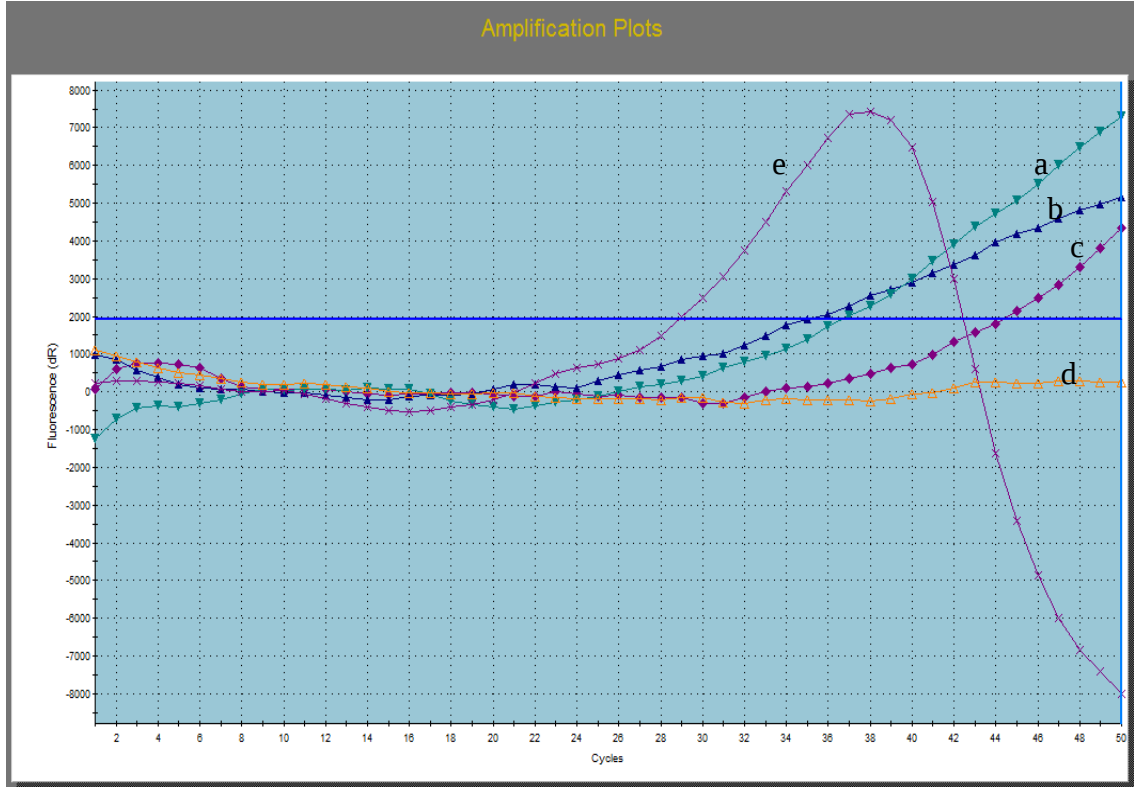
Şekil 4.3. *T. equi* ve *B. caballi* pozitif saptanan bazı örneklerin duplex TaqMan Real Time PCR da amplifikasyon grafikleri a,b: *T. equi*, c,d: *B. caballi*, e: No DNA



Şekil 4.4 Real Time PCR’da *T. equi* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı



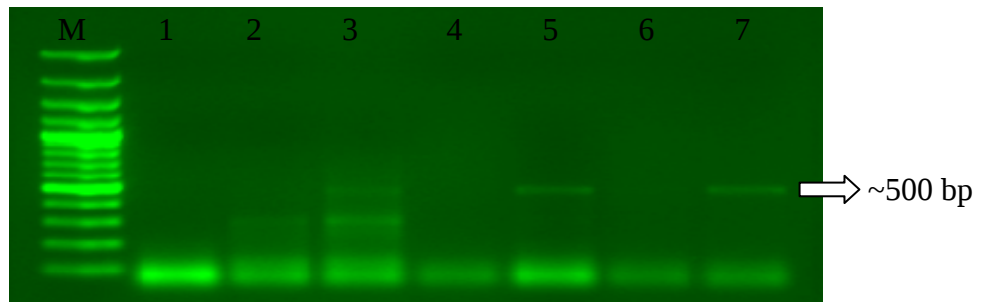
Şekil 4.5. Real Time PCR’da *B. caballi* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı



Şekil 4.6. *B. caballi* Real Time PCR standart kiti (PrimerDesign Ltd, Genesig, İngiltere) ile bazı örneklerde saptanan amplifikasyon eğrileri a,b: *T. equi*, c: *B. caballi*, d: No DNA, e: *B. caballi* pozitif kontrol

4.2. 18S rRNA GENİNİN AMPLİFİKASYON SONUÇLARI

Real Time PCR analizlerinde *T. equi* ve *B. caballi* belirlenen tüm örnekler ve negatif örneklerin parsiyel 18S rRNA gen bölgesinin PCR analizleri sonucunda *T. equi* pozitif 4 ve *B. caballi* pozitif 1 olmak üzere toplam 5 izolattın jel üzerinde ~500 bp büyüklüğünde amplifikasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bazı pozitif izolatlarda parsiyel 18S rRNA gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen ampliconların %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.7'da verilmiştir.



Şekil 4.7. Piroplasm türlerinin parsiyel 18S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 3,5,7: Pozitif izolatlara; 1,2,6: Negatif örnekler; 4: No DNA

4.3. REAL TIME PCR VE KONVANSİYONEL PCR SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Piroplasmosis yönünden Konvansiyonel PCR sonuçlarının Real Time PCR sonuçları ile karşılaştırmalı analizi Tablo 4.2’de verilmiştir. Tablo 4.2’de görüldüğü üzere PCR pozitif 5 örneğin TaqMan Real Time PCR analizleriyle de tümü piroplasmosis pozitif olarak saptanmıştır. PCR negatif 198 örneğin ise TaqMan Real Time PCR analizleriyle 5’i piroplasmosis pozitif ve 193’ü de negatif olarak saptanmıştır. Konvansiyonel PCR’ın Real Time PCR tekniği ile kıyaslanması sonucu %50,0 sensitivite ve %100,0 spesifite gösterdiği belirlenmiştir. Kappa testi ile Real Time PCR ve konvansiyonel PCR testleri arasında %65,5 ($p<0,01$) uyum saptanmıştır.

Tablo 4.2. İncelenen hayvanlarda Konvansiyonel ve Real Time PCR (Gold test) analiz sonuçlarının karşılaştırılması

		Real Time PCR (Gold Test)			Sensitivite (%95 güven aralığı)	Spesifite (%95 güven aralığı)
		+	-	Toplam		
Konvansiyonel PCR	+	5	0	5	0,50 (0,24-0,76)	1,00 (0,98-1,00)
	-	5	193	198		
	Toplam	10	193	203		

4.4. ATLARDA PİROPLASMOSİS’İN PREVALANSINDA YAŞ, CİNSİYET VE İRK FAKTÖRLERİNİN ANALİZİ

B. caballi ve *T. equi* pozitif belirlenen örneklerin parazit türü temel alınarak atların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımları ve istatistiksel verileri Tablo 4.3’de verilmiştir. Tablo 4.3’de görüldüğü üzere atların yaş gruplarına göre *T. equi* prevalansı 0-3 yaş, 4-6 yaş ve >6 yaş gruplarında sırasıyla 2,94, 3,22 ve 2,88 belirlenmiş olup gruplar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). *B. caballi* prevalansı ise 0-3 yaş, 4-6 yaş ve >6 yaş gruplarında sırasıyla 2,94, 3,22 ve 0,96 saptanmıştır. Benzer şekilde gruplar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Cinsiyete ve ırka bağlı olarak *T. equi* ve *B. caballi* türlerinin dağılımları arasında istatistiksel bir önem görülmemiştir ($p>0,05$).

Toplam 203 atta piroplasm türlerinin prevalansı incelendiğinde, *T. equi* %2,95 oranla *B. caballi*'den (%1,97) daha yaygın belirlenmiş olmasına karşın iki türün prevalansları arasındaki farklılık önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur.

Tablo 4.3. Atlarda piroplasmosis prevalansının türlere göre yaş, cinsiyet ve ırkla ilişkisi

Faktör	İncelenen at sayısı	Tür	Enfektif at		χ^2	P
			Sayısı	%		
Yaş grupları (yıl)						
0-3	68	<i>T. equi</i> ^a	2	2,94	0,010 ^a	0,995 ^a
		<i>B. caballi</i> ^b	2	2,94		
4-6	31	<i>T. equi</i> ^a	1	3,22	1,133 ^b	0,568 ^b
		<i>B. caballi</i> ^b	1	3,22		
>6	104	<i>T. equi</i> ^a	3	2,88		
		<i>B. caballi</i> ^b	1	0,96		
Cinsiyet						
Erkek	66	<i>T. equi</i> ^a	2	3,03	*	1,000 ^a
		<i>B. caballi</i> ^b	1	1,51		
Dişi	137	<i>T. equi</i> ^a	4	2,92	*	1,000 ^b
		<i>B. caballi</i> ^b	3	2,19		
İrk						
Arap	153	<i>T. equi</i> ^a	4	2,63	*	0,642 ^a
		<i>B. caballi</i> ^b	3	1,97		
İngiliz	50	<i>T. equi</i> ^a	2	3,92	*	1,000 ^b
		<i>B. caballi</i> ^b	1	1,96		
Toplam	203	<i>T. equi</i>	6	2,96	0,410	0,522
		<i>B. caballi</i>	4	1,97		

χ^2 : Pearson Chi-Square

*: Fisher's Exact Test

^{a,b}: Grupların piroplasm türüne göre istatistiksel verileri

T. equi ve *B. caballi* pozitif belirlenen örneklerde saptanan Ct (dR) değerlerinin türe göre dağılımı ve istatistik analizi Tablo 4.4'de verilmiştir. Ct (dR) değerlerine göre *T. equi* pozitif örneklerde parazitemi düzeyi *B. caballi* pozitif örneklere göre daha yüksek belirlenmesine karşın bu farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

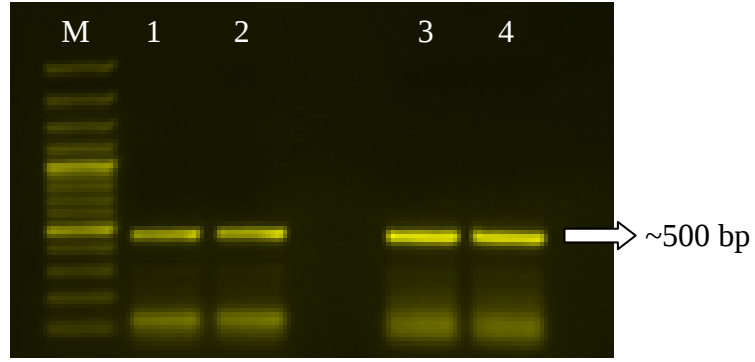
Tablo 4.4. Pozitif belirlenen örneklerde saptanan Ct (dR) değerlerinin parazit türüne göre dağılımı

Tür	Ct (dR)			t	P
	Ort	Min-Max	Standart Sapma		
B. caballi	38,20	35,08-41,22	3,36	1,495	0,174
T. equi	34,34	29,25-42,64	4,80		

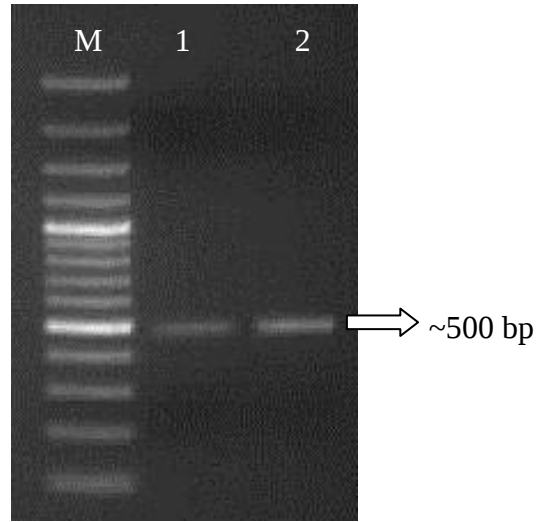
t: Independent Samples T Test

4.5. 18S rRNA GENİNİN SEKANSI

18S rRNA genini parsiyel olarak amplifiye eden primerler ile PCR sonucu pozitif belirlenen 5 izolattan yalnızca *T. equi*'ye ait olan iki izolat sekans analizleri için uygun konsantrasyonda belirlenmiş, diğer izolatların ise konsantrasyonlarının çok düşük ve bant profillerinin de çok silik olmasından dolayı sekans analizleri uygulanamamıştır. *T. equi*'ye ait 2 izolat sekans kalitesini artırabilmek için jel pürifikasyon sonrası tekrar aynı primerler ile PCR amplifikasyonuna tabii tutulmuştur (Şekil 4.8). Örnekler PCR amplifikasyonunu takiben tekrar jel pürifiye edilerek sekans için hazır hale getirilmiştir. Jel pürifikasyon sonrası *T. equi*'ye ait iki izolatın %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.9'da verilmiştir. 18S rRNA geni yönünden izolatlara ait DNA dizilerinin, konak, izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.5'de, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.10 ve 4.11'de verilmiştir.



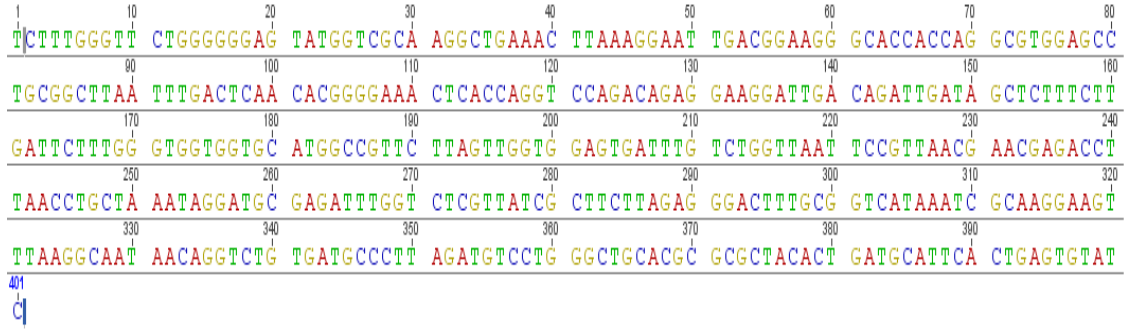
Şekil 4.8. *T. equi*'ye ait iki izolatın jel pürifikasyon sonrası 18S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile tekrar PCR sonucu elde edilen ampliconların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 1,2: BK-1 izolatı; 3,4: BK-2 izolatı



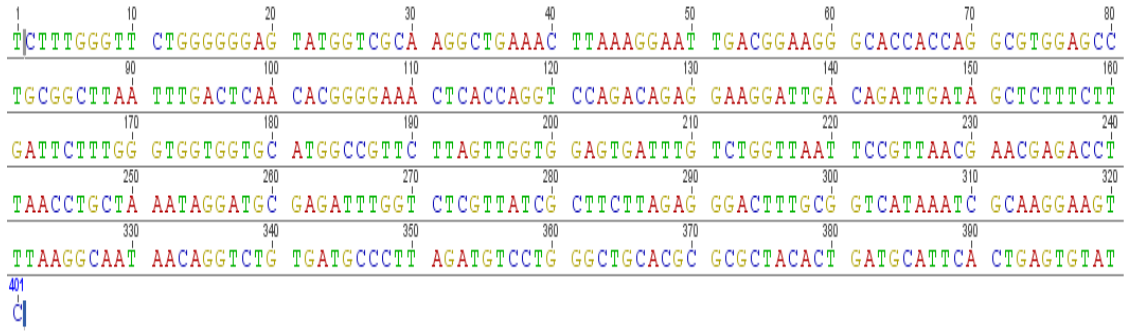
Şekil 4.9. *T. equi*'ye ait iki izolatın tekrar jel pürifikasyon sonrası ampliconların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 1: BK-1 izolatı; 2: BK-2 izolatı

Tablo 4.5. Bursa Karacabey yöresinde atlarda belirlenen izolatların incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler ve GenBank aksesyon numaraları

İzolat	Gen bölgesi	Konak ve izolasyon kaynağı	Tür	Aksesyon Numarası
BK-1	18S rRNA	At/ tam kan	<i>T. equi</i>	JX826603
BK-2	18S rRNA	At/ tam kan	<i>T. equi</i>	JX826604



Şekil 4.10. *T. equi* BK-1 izolatının sekans dizilimleri (JX826603)



Şekil 4.11. *T. equi* BK-2 izolatının sekans dizilimleri (JX826604)

4.6. 18S rRNA GENİNİN FİLOGENETİK ANALİZİ

Bursa yöresinde atlardan elde edilen *T. equi* izolatlarıyla 18S rRNA gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan Dünya'daki diğer bazı *T. equi* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank'tan alınarak Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer *T. equi* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	Orijin	İzolasyon kaynağı	Genotip	Aksesyon Numarası
Atbara1	Sudan	At	<i>Genotip D</i>	AB515307
Atbara2	Sudan	At	<i>Genotip D</i>	AB515308
Atbara5	Sudan	At	<i>Genotip D</i>	AB515309
Atbara8	Sudan	At	<i>Genotip B</i>	AB515310
Atbara13	Sudan	At	<i>Genotip D</i>	AB515311
Khartoum North15	Sudan	At	<i>Genotip D</i>	AB515312
Omdurman2	Sudan	At	<i>Genotip D</i>	AB515313
Kosti5	Sudan	At	<i>Genotip D</i>	AB515314
El Obied46	Sudan	At	<i>Genotip D</i>	AB515315
Bizkaia	İspanya	At	<i>Genotip E</i>	AY534882
A2_RBEQ101	Güney Afrika	At	<i>Genotip B</i>	EU642507
A1_RBEQ178	Güney Afrika	At	<i>Genotip A</i>	EU642508
B_RBEQ105	Güney Afrika	At	<i>Genotip D</i>	EU642509
B_LFEQ47	Güney Afrika	At	<i>Genotip C</i>	EU642510
B_LFEQ164	Güney Afrika	At	<i>Genotip C</i>	EU642511
RBEQ63_A	Güney Afrika	At	<i>Genotip A</i>	EU888902
LFEQ189_C	Güney Afrika	At	<i>Genotip C</i>	EU888903
LFEQ178_C	Güney Afrika	At	<i>Genotip C</i>	EU888905
LFEQ23_A	Güney Afrika	At	<i>Genotip A</i>	EU888906
KNU GG-7	Güney Kore	At	<i>Genotip E</i>	HM229407
KNU GG-14	Güney Kore	At	<i>Genotip E</i>	HM229408
Suwaymah-1T	Ürdün	Deve	<i>Genotip A</i>	JN596981
Suwaymah-2	Ürdün	Deve	<i>Genotip A</i>	JN596982
Wadi Araba-1T	Ürdün	Deve	<i>Genotip A</i>	JN596983
Suwaymah-4	Ürdün	At	<i>Genotip E</i>	JN596986
Suwaymah-5	Ürdün	At	<i>Genotip A</i>	JN596987
Suwaymah-6	Ürdün	At	<i>Genotip D</i>	JN596988
Suwaymah-7	Ürdün	At	<i>Genotip A</i>	JN596989
Suwaymah-8	Ürdün	At	<i>Genotip A</i>	JN596990
Ho233	ABD	At	<i>Genotip C</i>	JQ390047

Bursa Karacabey yöresinde atlarda pozitif belirlenen ve nükleotid dizisi ortaya konan *T. equi* izolatları ile Dünyanın çeşitli ülkelerinden multiple alignmenta dahil edilen diğer izolatların 18S rRNA gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Tablo 4.7'de, pairwise alignmentları ise Şekil 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Multiple alignmentları yapılan *T. equi* izolatları ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları

İzolat	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)	Toplam nükleotid sayısı
BK-1	27,7	19,5	23,4	29,4	51,1	48,9	401,0
BK-2	27,7	19,5	23,4	29,4	51,1	48,9	401,0
Atbara1	29,4	18,7	25,7	26,2	55,1	44,9	1545,0
Atbara2	29,3	18,7	25,5	26,5	54,8	45,2	1545,0
Atbara5	29,4	18,8	25,6	26,2	55,0	45,0	1542,0
Atbara8	28,4	19,1	25,6	26,9	54,0	46,0	1541,0
Atbara13	29,2	19,0	25,4	26,4	54,6	45,4	1509,0
Khartoum North15	29,4	18,9	25,6	26,1	55,0	45,0	1543,0
Omdurman2	29,2	18,7	25,6	26,5	54,8	45,2	1564,0
Kosti5	29,3	18,9	25,6	26,3	54,8	45,2	1545,0
El Obied46	29,4	18,8	25,4	26,4	54,8	45,2	1541,0
Bizkaia	29,0	18,8	25,7	26,5	54,8	45,2	1749,0
A2_RBEQ101	28,4	19,3	25,6	26,7	54,0	46,0	1573,0
A1_RBEQ178	28,8	19,3	25,1	26,8	53,9	46,1	1519,0
B_RBEQ105	29,5	18,3	25,8	26,4	55,3	44,7	1481,0
B_LFEQ47	29,4	18,0	26,0	26,7	55,4	44,6	1470,0
B_LFEQ164	29,2	18,9	25,4	26,5	54,6	45,4	1573,0
RBEQ63_A	29,0	19,0	25,3	26,7	54,3	45,7	1567,0
LFEQ189_C	29,2	18,7	25,8	26,3	55,0	45,0	1569,0
LFEQ178_C	29,3	18,7	25,5	26,6	54,8	45,2	1563,0
LFEQ23_A	29,0	18,8	25,1	27,0	54,2	45,8	1532,0
KNU GG-7	29,1	18,7	25,6	26,6	54,7	45,3	1661,0
KNU GG-14	29,1	18,7	25,6	26,6	54,7	45,3	1661,0
Suwaymah-1T	27,8	19,1	23,6	29,6	51,3	48,7	450,0
Suwaymah-2	27,8	19,3	23,6	29,3	51,3	48,7	450,0
Wadi Araba-1T	27,8	19,3	23,6	29,3	51,3	48,7	450,0
Suwaymah-4	27,1	19,3	24,0	29,6	51,1	48,9	450,0
Suwaymah-5	27,6	19,6	23,6	29,3	51,1	48,9	450,0
Suwaymah-6	27,6	19,3	23,8	29,3	51,3	48,7	450,0
Suwaymah-7	27,6	19,3	23,3	29,8	50,9	49,1	450,0
Suwaymah-8	27,8	19,3	23,6	29,3	51,3	48,7	450,0
Ho233	29,4	18,7	25,5	26,4	54,9	45,1	1585,0
Ortalama	28,2	19,2	26,3	26,3	54,5	45,5	1742,0

Bursa Karacabey yöresinden elde edilen *T. equi* izolatları ile Dünya'da GenBank'a kayıtlı diğer bazı *T. equi* izolatlarının, parsiyel 18S rRNA gen bölgelerinin multible alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.13'de gösterilmiştir.

1

20

30

40

50

60

70

80

90

100

110

120

130

140

150

160

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

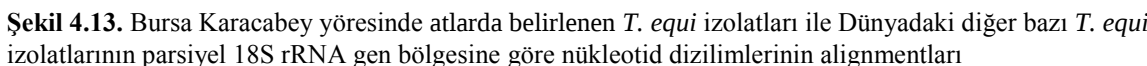
27

28

29

30

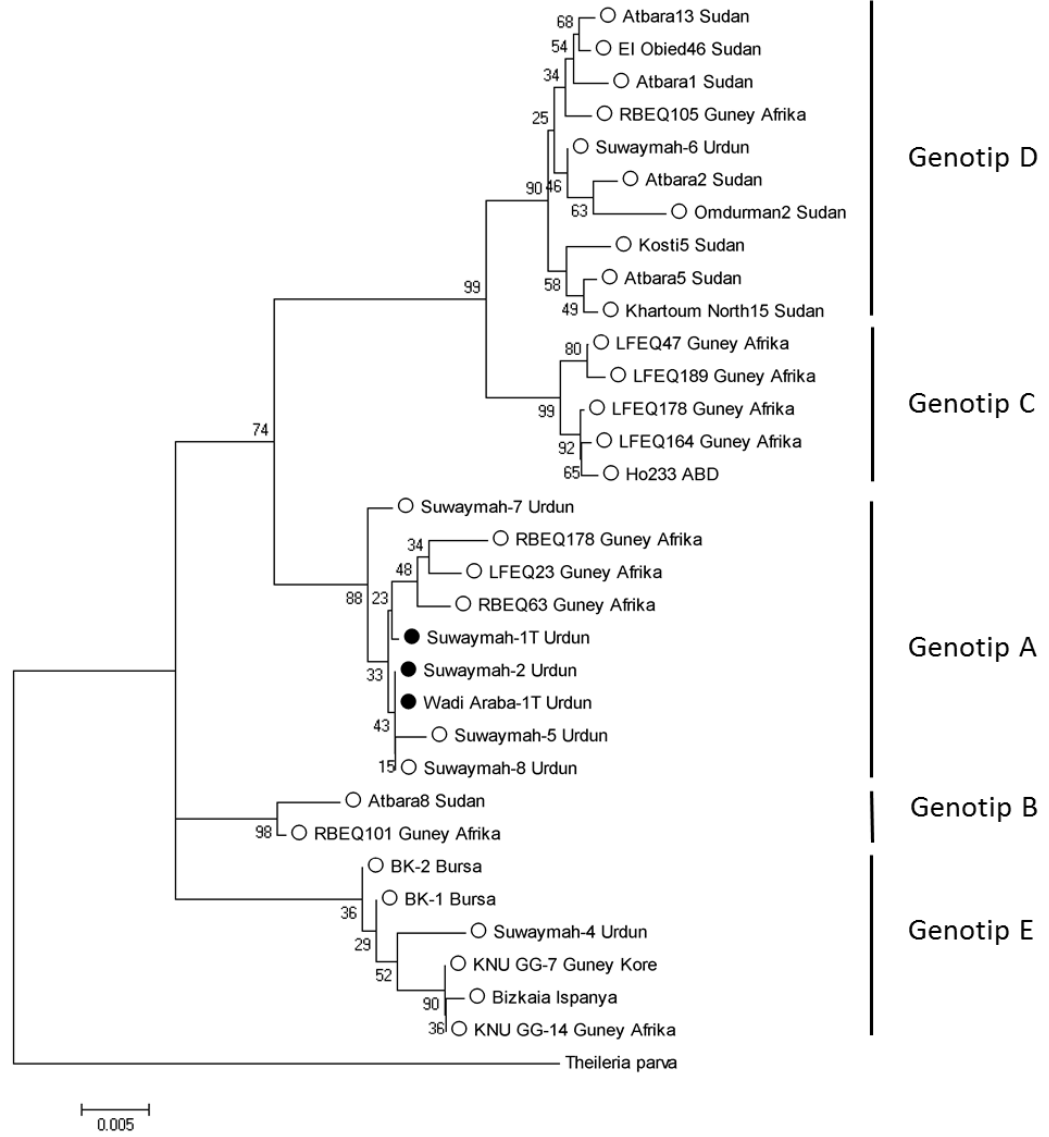
31



Şekil 4.13’de görüldüğü gibi 18S rRNA gen bölgesine göre saptanan *T. equi* izolatları ile diğer izolatlar arasında genotiplere özgü olarak çeşitli nükleotid değişimleri, delesyonları ve insertionları belirlenmiştir.

T. equi izolatlarının (BK-1, BK-2) pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında %100 identik oldukları ve dünyadan alignmentta dahil edilen diğer izolatlarla aralarında ortalama $2,5 \pm 0,6$ farklılık gösterdikleri saptanmıştır. Bursa Karacabey yöresinde atlarda saptanan *T. equi* izolatlarının (BK-1, BK-2) ayrıca İspanya (AY534882) ve Güney Kore’de (HM229407, HM229408) atlardan izole edilen izolatlarla da %100 identik olduğu belirlenmiştir.

Bursa Karacabey yöresinde atlarda saptanan *T. equi* izolatları ile Dünyadan diğer bazı *T. equi* izolatlarının Neighbor Joining Metodu (Kimura 2 Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.14’de verilmiştir. Filogenetik ağaçta da görüleceği üzere saptanan izolatların *T. equi* Genotip E’de yer aldığı belirlenmiştir. Genetik farklılık, BK-1 ve BK-2 izolatlarının yer aldığı E genotipi ile A, B, C ve D genotipleri arasında sırasıyla $1,6 \pm 0,3$; $0,9 \pm 0,2$; $2,4 \pm 0,3$; ve $2,4 \pm 0,3$ olarak saptanmıştır.



Şekil 4.14. Bursa Karacabey yöresinde saptanan *T. equi* izolatları ile GenBank’a kayıtlı diğer *T. equi* izolatların 18S rRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter modeli). Semboller; ●: Deve, ○: At izolatları; Dış grup olarak *Theileria parva* (L02366) kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Babesiosis, *Babesia* soyundaki protozoon türlerinin neden olduğu bir hastalık olup hastalığa yol açan etkenler Ixodidae ailesine bağlı vektör kene türleri ile transovarial ve/veya transstadial olarak nakledilirler. Tektırnaklılarda piroplasmosis'e *B. caballi* (Nuttall, 1910) ve *B. equi* (Laveran, 1901) türleri sebep olmaktadır. Atlarda *B. bigemina*'ya benzeyen intraeritrositik protozoonlar ilk olarak 1899'da Guglielmi tarafından gözlenmiştir. Bunu takiben 1901 ve 1902'de Theiler, *B. equi*'nin sebep olduğu, tektırnaklı babesiosisini ilk olarak tarif etmiş, 1901'de Laveran bu küçük etkeni *B. equi* olarak isimlendirmiştir. Theiler 1905'te zebralarda *B. equi*'yi tespit etmiş ve kan inokulasyonu ile zebradan ata nakletmiştir. Bu tarihten sonra, *B. equi* ile enfekte *Rhipicephalus evertsi* vasıtasıyla zebralarda hastalığın meydana geldiği görülmüştür. Son yıllarda ise *B. equi*'nin hem omurgalıda (lenfositer şizogoni) hem de vektör kenede (transovarial geçiş yoktur) gelişmesinin deneysel olarak ortaya konması ile *Theileria* türlerine benzediği tespit edilmiş ve bu yönüyle *T. equi* olarak isimlendirilmiştir. *T. equi*'nin yol açtığı hastalık atların theileriosis'i olarak isimlendirilmektedir. *B. caballi* ve *T. equi*'nin yol açtığı piroplasmosis perakut, akut veya kronik seyirli olup ateş, anemi, dsypnea, ikterus, hepatosplenomegaly, ödem, intravasküler hemoliz, mukazalarda peteşiyel kanamalar, hemoglobinuri ve ölüm ile seyredebilir (35, 125). Tektırnaklı piroplasmosis etkenlerinin coğrafik dağılımları vektör kenelerin yayılışları ile yakından ilgilidir (2, 17).

Ekonomik öneme sahip olan tektırnaklı piroplasmosis'inin, uluslararası ticaret ve ülkeler arasındaki hayvan hareketlerinin artışına bağlı olarak global önemi gün geçtikçe artmaktadır (87, 103). Ancak, dünyanın birçok bölgesinde tektırnaklı piroplasmosis'inin epidemiyolojisi hakkındaki bilgi oldukça sınırlıdır. Bazı ülkelerde equidelerde çeşitli *Theileria* ve *Babesia* genotipleri tarif edilmekle birlikte bu genotiplerin bazılarının yeni türler olabileceği de hipotez edilmiştir (126, 127). Bunun yanında canine piroplasmosis etkeni *B. canis canis* (13, 128) ve sığır piroplasmosis etkeni *B. bovis*'in de (129) atlarda görüldüğüne dair kayıtlar bulunmaktadır.

Türkiye'de günümüze kadar atlarda piroplasmosis üzerine çalışmaların daha çok konvansiyonel ve serolojik teşhis yöntemleriyle yapılmış olup moleküler prevalans çalışmaları sınırlı, moleküler karakterizasyon çalışmaları ise bulunmamaktadır. Değişik coğrafik yapı ve mevsime ait farklı bölgelerde perifer kan froti muayenesiyle atlarda yapılan çalışmalarda; Gemlik Askeri Harasında 133 atta *B. caballi* %12,0, *T. equi* %6,0 (18); Malatya'da 130 atta *B. caballi* %3,0, *T. equi* %11,5 (71); Kayseri'de 89 atta *B. caballi* %7,9, *T. equi* %4,5 (70); Türkiye'nin doğu sınırında 110 atta *T. equi* %58,2 (72); Türkiye'nin farklı bölgelerindeki 666 atta *T. equi* %0,15 (31); Ege Bölgesi'nde 205 atta *B. caballi* %0,5, *T. equi* %0,5 (73) olarak rapor edilmiştir.

Serolojik çalışmalarda atlarda *B. caballi* seropozitifliği, IFAT ile Doğu Anadolu sınır bölgesinde %4,5 (72); Türkiye genelinde IFAT ile %11,1, CFT ile %0,9 (31); Marmara'da IFAT ile %13,3, CFT ile %1,0; Ege'de IFAT ile %7,0 (73); Malatya'da IFAT ile %2,5 (75); Akdeniz bölgesinde IFAT ile %30, CFT ile %1,81 ve Karadeniz Bölgesinde IFAT ile %12,5 (76) olarak saptanmıştır. Türkiye genelinde CFT ile %0,58 (77), cELISA ile %1,46 (78), Karadeniz Bölgesinde IFAT ile %38,0 (79), Niğde'de IFAT ile %9,6 (80), Kars ve Ardahan yöresinde cELISA ile %29,3 (81) olarak tespit edilmiştir.

T. equi'nin atlardaki seropozitifliği; Doğu Anadolu'nun sınır bölgesinde IFAT ile %64,5 (72), Türkiye genelinde IFAT ile %25,7, CFT ile %19,7 (31), Marmara'da IFAT ile %3,8, CFT ile %4,8, Ege'de IFAT ile %42,0, CFT ile %30,0 (73), IFAT ile Kars yöresinde % 25,0 (74), Malatya'da IFAT ile %20,5, CFT ile %18,0 (75), Akdeniz bölgesinde IFAT ile %23,5, CFT ile %11,8 ve Karadeniz Bölgesinde IFAT ile %15,7 ve CFT ile %8,4 (76), IFAT ile İç Anadolu'da %26,0; Doğu Anadolu'da %22,7 ve Güneydoğu Anadolu'da %43,8, CFT ile İç Anadolu'da %29,0; Doğu Anadolu'da

%19,3 ve Güneydoğu Anadolu’da % 31,4 olarak bulunmuştur (31). cELISA ile Adana yöresinde yapılan araştırmada (77) *T. equi*’nin seroprevalansı %56,8 olarak saptanmıştır (8). *T. equi* seropozitifliği Türkiye genelinde CFT ile %16,55, cELISA ile %16,21 (78), Karadeniz Bölgesinde IFAT ile %23,8 (79), Niğde’de IFAT ile %12,8 (80), Kars ve Ardahan yöresinde cELISA ile %19,0 (81), Adana ilinde cELISA ile %56,8 (82) olarak tespit edilmiştir. Türkiye’nin farklı coğrafik bölgelerindeki illerde CFT ve IFAT ile 300 atta mikroskopik bakıda %6,6; CFT testinde %34,6 (*T. equi* %33; *B. caballi* %0,3; %1,3 *T. equi*+*B. caballi*) ve IFAT testinde %61,0 (*T. equi* %34,3; *B. caballi* %10,0; %16,6 *T. equi* + *B. caballi*) oranında pozitiflik tespit edilmiştir (83).

Sınırlı sayıdaki moleküler prevalans çalışmalarında ise Ankara’da 200 atta konvansiyonel PCR ile *B. caballi* pozitifliği %3,0, *T. equi* pozitifliği %7,0 (12); Türkiye’nin farklı coğrafik bölgelerindeki illerde bulunan 300 atta Nested PCR ile *T. equi* %44,6; *B. caballi* %2,3 ve *T. equi* + *B. caballi* miks enfeksiyonu %5,0 oranında tespit edildiği öne sürülmüştür (83).

Bu çalışmada TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizleriyle incelemesi yapılan ve Bursa Karacabey yöresinde Tarım İşletmesi Müdürlüğünden örneklenen 153 atın 4’ünde *T. equi*, 3’ünde ise *B. caballi* pozitifliği belirlenirken Türkiye Jokey Kulübü’nden örneklenen 50 atın 2’sinde *T. equi*, 1’inde ise *B. caballi* pozitifliği tespit edilmiş, miks enfeksiyonlara rastlanılmamıştır. Araştırma yöresinde incelenen atlarda *T. equi* prevalansı (%2,96) *B. caballi* prevalansından (%1,97) yüksek belirlenmesine karşın bu farklılık istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur. Benzer şekilde Ct (dR) değerlerine göre *T. equi* pozitif örneklerde parazitemi düzeyi *B. caballi* pozitif örneklerle göre daha yüksek tespit edilmesine karşın bu farklılık da istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur *T. equi* ve *B. caballi* için araştırma yöresinde belirlenen prevalans oranları Türkiye’de at piroplasmosis’i üzerine konvansiyonel ve serolojik tekniklerle yapılmış diğer bazı çalışmalarda (31, 70-73, 75-78) belirlenen prevalans oranlarına yakın bulunurken genel olarak serolojik tabanlı teşhis yöntemleri ile elde edilen prevalans oranlarından daha düşük olduğu dikkati çekmiştir. Nitekim birçok çalışmada (37, 130-133) antikor arama tabanlı serolojik yöntemlerin, hastalığın erken veya latent döneminde duyarlılıklarının düşük olduğu, çapraz reaksiyonlara bağlı yanlış sonuçlara yol açabildiği, özellikle *B. caballi* ile enfeksiyonlarda hastalığı atlatan hayvanlarda ve tedavi sonrası antikorların 3 yıla kadar mevcudiyetini koruması sebebiyle hastaları

ortaya koymada yetersiz olduğu ve bu testlerle elde edilen yüksek prevalansın genellikle bu sonuca bağlı olarak ortaya çıktığı kaydedilmiştir. Buna karşın *T. equi*'nin antiprotozoer ilaçlara dirençli olduğu ve tedavi sonrasında dahi enfekte atların bu etkeni ömür boyu taşıdıkları bildirilmiştir (60).

Tek tırnaklılarda piroplasmosis'e yol açan etkenleri klinik olgulardan, rezervuar konaklardan ve vektör kenelerden izole etmek amacıyla konvansiyonel PCR, Nested PCR ve RLB gibi moleküler tanı yöntemleri son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (87, 110, 126, 127, 134). Real-time PCR tekniği, hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle son yıllarda öne çıkan tekniklerin başında gelmektedir. Ayrıca bu teknik ile mutasyon analizleri ve gen ekspresyonları da hassas bir şekilde belirlenebilmektedir. Son yıllarda tek tırnaklı piroplasmosis'inin tür spesifik teşhisinde de kullanılmaya başlanan Real Time PCR tekniğinde, özellikle 18S rRNA gibi gen bölgelerini hedef alarak spesifik primer ve probalar ile araştırmaların yapıldığı dikkati çekmektedir (60, 61, 113). Real Time PCR tekniği sahip olduğu yüksek sensitivite ve spesifitenin yanında kantitatif analize olanak sağlaması, kontaminasyon riskinin çok daha düşük olması ve hızlı sonuç vermesi gibi çeşitli özellikleri ile konvansiyonel PCR, nested PCR ve antijen veya monoklonal antikor tabanlı ELISA gibi çeşitli tekniklere göre üstün bir tekniktir (60, 61, 113). Bu çalışmada da söz konusu avantajları nedeniyle araştırma yöresinde atlarda piroplasmosis'in durumunu net olarak ortaya koyabilmek amacıyla, *T. equi* ve *B. caballi* tür spesifik 18S rRNA (ribozomal RNA) gen bölgesini hedef alan spesifik primer ve TaqMan problemlerin kullanıldığı Real Time PCR tekniği, Türkiye'de ilk kez bu alanda temel teşhis yöntemi olarak kullanılmıştır. Söz konusu teknik ile eş zamanlı olarak *T. equi* ve *B. caballi* pozitiflikleri spesifik bir şekilde ortaya konmuş, Ct (dR) değerleri belirlenerek örneklerdeki parazitemi hakkında veriler elde edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca konvansiyonel PCR ile pozitif belirlenen 5 örneğin TaqMan Real Time PCR analizleriyle de tümü piroplasmosis pozitif olarak saptanmıştır. PCR negatif 198 örneğin ise TaqMan Real Time PCR analizleriyle 5'i piroplasmosis pozitif ve 193'ü de negatif olarak tespit edilmiştir. Konvansiyonel PCR'ın Real Time PCR tekniği ile kıyaslanması sonucu %50,0 sensitivite ve %100,0 spesifite gösterdiği belirlenmiştir. Kappa testi ile Real Time PCR ve konvansiyonel PCR testleri arasında %65,5 ($p<0,01$) uyum saptanmıştır. Real Time PCR'da pozitif belirlenen ve Ct (dR) değerleri yüksek olan (≥ 34) örneklerin

PCR analizleri sonrası agaroz jel üzerinde amplifikasyon belirlenememiş veya çok silik bantlar tarzında ortaya çıktığı görülmüş olup bu izolatlar üzerine sekanslama analizlerinin yapılması mümkün olmamıştır. Bu açıdan çeşitli araştırmacıların da (60, 61) belirttiği gibi parazitin biyolojik döngüsünde devamlılığı sağlayan ve hastalığın vektör kene ve diğer konaklara geçmesinde primer öneme sahip düşük parazitemili rezervuarların belirlenmesinde Real Time PCR tekniğinin çok daha güvenilir bir yöntem olarak ortaya çıktığı görülmüştür.

Bununla birlikte *T. equi* ve *B. caballi* spesifik TaqMan Real Time PCR analizlerinin kontrolü amacıyla uygulanan *B. caballi* Real Time PCR standart kiti (PrimerDesign Ltd, Genesig, İngiltere) ile *T. equi* ve *B. caballi* pozitif belirlenen tüm örneklerin amplifikasyon gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca sekans analizleriyle konfirme edilen ve miks enfeksiyon olmadığı belirlenen *T. equi* izolatlarının da söz konusu kit amplifikasyon göstermesi, üreticinin *B. caballi* spesifik olarak belirtip kullanıma sunduğu söz konusu kitin tür bazlı spesifitesinin olmadığını ortaya koymuştur.

Konvansiyonel teşhis yöntemleriyle elde edilen pozitiflikler, genotip düzeyinde identifikasyona olanak vermemekte (15, 127), buna karşın moleküler olarak yapılan genotipleme sayesinde tek tırnaklı piroplasmosis etkenleri filogenetik olarak karakterize edilebilmektedir. Bunun yanında moleküler karakterizasyon sayesinde farklı suşlar arasındaki genetik varyasyonların ortaya konması ile coğrafik bölgeler arasındaki ilişkiler de araştırılabilmektedir (15, 62). Piroplasm türlerinin ve genotiplerinin ortaya konmasında en çok kullanılan gen bölgelerinin başında small subunit ribosomal RNA (SSU-rRNA) geni gelmektedir. SSU-rRNA gen bölgesinin genotiplemede yaygın olarak kullanılması, genel olarak bu gen bölgesinin çoklu-kopya yapısında (multi-copy nature) olmasından ve genom içerisinde yüksek düzeyde korunmuş (semi-conserved) bölgeler içermesinden ileri geldiği kaydedilmiştir (135-139).

İlk kez Chae ve ark. (140), Kore, Japonya ve Kuzey Amerika'nın çeşitli bölgeleri gibi farklı coğrafik bölgelerden izole ettikleri 14 *Theileria* izolatını, 18S rRNA geninin değişken bir bölgesine göre (V4) 7 farklı genotip (Genotip A-G) içinde klasifiye etmişlerdir. A, B, C, D ve E genotiplerinin sığır ve bir geyik türündeki (elk) parazitlerde, genotip F ve G'nin ise sırasıyla elk ve beyaz kuyruklu geyiklerdeki (white-tailed deer) parazitlerde bulunduğu belirlenmiştir (140). Bazı özgün izolatların ise birden fazla SSU rRNA gen tipine sahip olduğu ortaya konmuştur. Chae ve ark. (141),

Theileria 18S rRNA G genotipinin beyaz kuyruklu geyik ve elklerden izole edilen izolatların sekanslarındaki mikroheterojeniteye göre G1, G2, ve G3 alt genotiplerinden oluştuğunu ortaya koyarken F genotipinin geyik ve elklerdeki izolatlarda nükleotid sekanslarının identik olduğunu saptamışlardır.

Diğer yandan *T. equi*'deki genetik çeşitliliğin diğer tüm *Theileria* türlerinden daha yüksek olduğu ileri sürülmüştür (142). Genotip çeşitliliği ilk kez Nagore ve ark. (126) İspanya'dan rapor etmişlerdir. Buna göre *T. equi* türü içinde *T. equi* ve *T. equi*-like genotipleri klasifiye edilmiştir (126). Daha sonraki çalışmalarda Bhoora ve ark. (127), Güney Afrika'da atlardan elde ettikleri izolatlar üzerine yaptıkları araştırmada, *T. equi* izolatlarını Genotip A, B ve C olmak üzere 3 heterojenik genotip içinde klasifiye etmişlerdir. Bu klasifikasyon içinde *T. equi* ve *T. equi*-like genotipleri sırasıyla Genotip A ve B olarak isimlendirilmiştir. Son zamanlarda Sudan'da yapılmış bir çalışmada da Genotip A, B ve C'nin yanında yeni bir genotip daha bulunmuş ve Genotip D olarak klasifiye edilmiştir (139). Qablan ve ark. (15), Ürdün'de deve ve atlardan izole ettikleri *T. equi* izolatlarının 18S rRNA gen bölgesine göre filogenisini araştırmışlar ve bir atta bulunan izolatın (Suwaymah-4, JN596986) Güney Kore'de atlardan izole edilmiş iki izolat (HM229408, HM229407) ve İspanya'dan daha önce Genotip B olarak bildirilen bir izolatla (AY534882) birlikte ayrı bir grupta yer aldığını belirlemişler ve bu genotipi Genotip E olarak klasifiye etmişlerdir. *T. equi* (Genotip A) ve *T. equi*-like (Genotip B) genotiplerinin İspanya (126), Yunanistan (62), Sudan (139), Güney Afrika (127) ve Ürdün (15) gibi çeşitli ülkelerde bildirilmiş olması bu genotiplerin yaygın olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (15, 62).

Bu çalışmada Türkiye'de ilk kez atlarda piroplasmosis'e yol açan türlerden *T. equi*'nin moleküler karakterizasyonu ve genotiplendirilmesi yapılmıştır. Buna göre Bursa Karacabey yöresinde atlardan elde edilen *T. equi* BK-1 ve BK-2 izolatlarının kendi aralarında %100 identik oldukları ve dünyadaki diğer *T. equi* izolatlarıyla aralarında ortalama $2,5 \pm 0,6$ farklılık gösterdikleri saptanmıştır. Bu iki izolatın (BK-1, BK-2) ayrıca İspanya (AY534882) ve Güney Kore'de (HM229407, HM229408) atlardan izole edilen izolatlarla da %100 identik olduğu tespit edilmiştir. 18S rRNA geninin filogenetik analizi sonucunda bu çalışmada saptanan BK-1 ve BK-2 izolatlarının *T. equi* Genotip E'de yer aldığı görülmüştür. Ayrıca genetik farklılık analizlerine göre E genotipinin diğer genotiplere (%1,6-2,4) oranla B genotipine (*T. equi*-like) (%0,9) daha

yakın olduğu saptanmıştır. *T. equi*-like genotipinin (Genotip B) *T. equi* genotipine (Genotip A) göre daha yüksek patojeniteye sahip olduğu ve oluşturdıkları enfeksiyonların genellikle atlarda ölümle sonuçlandığı ileri sürülmüştür (62, 126). Bu çalışmada saptanan izolatların yer aldığı E genotipinin, patojenitesi yüksek B genotipine yakınlığı araştırma yöresindeki atlar için risk potansiyeli oluşturmaktadır. Dolayısıyla Türkiye’de tek tırnaklılarda piroplasmosis’e yol açan türlerin moleküler genotiplendirilmesine ve oluşturdıkları patojeniteye dair kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

B. caballi ve *T. equi*’nin antikor tabanlı serolojik çalışma sonuçlarına göre tüm yaş gruplarında görülebildiği ve ileri yaştaki atlarda (4-9 yaş) prevalansın daha yüksek olduğu ileri sürülmüştür (3, 29, 48). Bu çalışmada da *B. caballi* ve *T. equi* moleküler prevalanslarının atların yaş gruplarına göre farklılık göstermediği saptanmıştır. Cinsiyetin *B. caballi* ve *T. equi* prevalansına etkisinin olmadığını gösteren birçok çalışmadaki gibi (48, 70, 72) bu çalışmada da prevalans üzerinde cinsiyetin etkisinin olmadığı istatistiksel olarak ortaya konmuştur. Benzer şekilde at ırkları arasında da enfeksiyon açısından istatistiksel bir farklılığın olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışma ile Bursa Karacabey yöresi atlarında piroplasmosis’in moleküler prevalansı ve izolatların genotipleri saptanmıştır. Enfeksiyondan sorumlu tür ve genotipler, bu alanda Türkiye’de ilk kez kullanılan Real Time PCR tekniği ve 18S rRNA geninin sekans analizleriyle ortaya konmuştur. Moleküler ve filogenetik analizler sonucu araştırma yöresinde primer yaygınlık gösteren türün *T. equi* olduğu; *B. caballi*’nin ise daha düşük prevalansa sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada Real Time PCR tekniğinin, sahip olduğu yüksek sensitivite ve spesifitenin yanında, eş zamanlı hızlı teşhise ve kantitasyona olanak sağlaması ve paraziteminin belirlenebilmesi, dolayısıyla tedavi etkinliğinin takibi ve kontaminasyon riskinin minimize olması gibi avantajlarıyla tek tırnaklı piroplasmosis’inin teşhisinde yüksek etkinliğe sahip olduğu görülmüştür. Real Time PCR tekniğinin sahip olduğu bu avantajlarıyla özellikle moleküler epidemiyolojik çalışmalarda ve rezervuarların belirlenmesinde öne çıktığı dikkati çekmiştir. Ayrıca bu araştırma ile Bursa Karacabey yöresinde atlarda belirlenen *T. equi* izolatlarının E genotipinde yer aldığı da ortaya konmuştur. Bu genotipin muhtemel patojenik potansiyeli göz önüne alındığında, yetiştiriciler, veteriner hekimler ve epidemiyolojistlerin işbirliği yaparak hastalığa karşı

etkin kontrol ve m¼cadele stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Çalışma bu haliyle T¼rkiye’de tek tırnaklı piroplasmosis’inin molek¼ler epidemiyolojisi, hastalıktan sorumlu t¼rler ve genotiplerin ortaya konması y¼n¼nde daha sonra yapılacak araştırmalara model olma niteliğindedir.

6. KAYNAKLAR

1. Türkiye İstatistik Kurumu. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/hayvancilikapp/hayvancilik.zul> Erişim Tarihi: 15.10.2012.
2. De Waal DT. Equine babesiosis. Br Vet J 1992; 148: 6-14.
3. Rommel M, Eckert J, Kutzer E, Körting W, Schneider T. Veterinärmedizinische Parasitologie (5), Rommel M, Boch J, Parey Buchverlag, Berlin, 2000: 915.
4. Holman PJ, Frerichs WM, Chieves L, Wagner GG. Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi* - infected horses. J Clin Microbiol 1993; 3: 698-701.
5. Weiland G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Vet Parasitol 1986; 20: 43-48.
6. Edwards RZ, Moore H, LeRoy BE, Latimer KS. Equine Babesiosis - A Review. Vet Pathol 2005; 185: 102-105.
7. Nalbantoğlu S. Protozoon Hastalıklarında Tedavi. In: Veteriner Hekimlikte Parazit Hastalıklarında Tedavi, Burgu A, Karaer Z Ed. İzmir, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, T Parazitol Dern Yayın No: 19, 2005: 73-77.
8. Kurt C. Adana Yöresi Atlarında *Babesia equi* ve *Babesia caballi*'nin Yayılışının Mikroskopik ve Serolojik (ELISA) yöntemlerle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hatay 2005: 46.
9. Gören S, Yetkin R. Tektırnaklılarda, Sığırdı, Koyunda, Keçide ve Köpekte Piroplasmosis, Ankara, MMB Baytar Bak Ser ve Aşı Evi Yayınları 1935.

10. Mimioglu M, Göksu K, Sayın F. Veteriner ve Tıbbi Protozooloji II. Ankara Üniv Basımevi, Ankara, 1969.
11. (2012) Taxonomicon. Evrensel Taksonomik Hizmetleri. <http://taxonomicon.taxonomy.nl/> Erişim Tarihi: 15.10.2012.
12. Güçlü Z, Karaer Z. Ankara yöresinde sportif ve gösteri amaçlı yetiştirilen atlarda *Babesia caballi* (Nuttall, 1910) ve *Theileria equi* (Syn. *Babesia equi*, Laveran, 1901)'nin yayılışının polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılması. Türkiye Parazit Derg 2007; 31: 89-93.
13. Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Saraña A, Barba-Carretero JC. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. Vet Parasitol 2003; 114: 173-194.
14. Hikosaka K, Watanabe Y, Tsuji N, et al. Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. Mol Biol Evol 2010; 27: 1107-1116.
15. Qablan MA, Sloboda M, Jirku M, et al. Quest for the piroplasms in camels: identification of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Jordanian dromedaries by PCR. Vet Parasitol 2012; 186: 456-460.
16. Levine ND. Veterinary Protozoology, 1 th Edition, Ames, Iowa State University Press. Iowa, 1985: 414.
17. Soulsby ELJ. Helminths, Artropods and Protozoa of Domesticated Animals, 7th. Edition. Bailliere Tindall, London, 1986: p.809.
18. İnci A. Gemlik askeri harası atlarında *Babesia caballi* (Nuttall, 1910) ve *Babesia equi* (Laveran, 1901)'nin mikroskopik muayeneye saptanması. Turkish Journal of Vet Anim Sci 1997; 21: 43-46.
19. Hodgson J. Equine Exotic Diseases, A manuel for horse owners. A report for the Rural Industries Resarch and Development Coporation, RIRDC Publication No02/054 RIRDC Project No US-103 A. 2002.
20. O'Neil BD. Ministry of Agriculture and Forestry, New Zelland. "Import risk analysis: horses and horse semen." Biosecurity Authority, Wellington, 2000: p 176-181.
21. Toparlak M, Tüzer E. Veteriner Protozooloji, İstanbul. İÜ Yayınları Ders Notu No:105, 1999.
22. Dumanlı N. Veteriner Protozooloji Ders Notları, Elazığ. FÜ Vet Fak Ders Teksiri No:54, 2002.
23. İnci A, Düzlü Ö, İça A. Babesiidae, In: Veteriner Protozooloji, Dumanlı N, Karaer Z. Medisan, Ankara, 2010: p 185-206.
24. Schein E, Rehbein G, Voigt WP, Zweggart E. *Babesia equi* (Laveran 1901) I. Development in horses and in lymphocyte culture. Tropenmed Parasitol 1981 Dec; 32: 223-227.

25. Rehbein G, Zweygarth E, Voigt WP, Schein E. Establishment of *Babesia equi*- infected lymphoblastoid cell lines. Z Parasitenkd 1982; 67: 125-127.
26. Purchase HS. Piroplasmosis in foal at birth. Vet Rec 1974; 59: p 449.
27. Erbslöh JFK. Babesiosis in the newborn foal. J Reprod Fert 1975; 23: 725-726.
28. Kaufmann J. Parasitic infections of Domestic Animals, A Diagnostic Manual. Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin. 1996: p 423.
29. Martin R. Equine Piroplasmosis: The temporary importation of seropositive horses into Australia, Aust Vet J 1999 May;77:308-9.
30. Mehlhorn H, Schein E. The piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. In: Baker JR, Muller R (eds), Advances in Parasitology. Academic Press 1984: p 69-89.
31. Balkaya İ. Türkiye'nin farklı bölgelerinde atlarda *Babesia equi* (Laveran, 1901) ve *Babesia caballi* (Nuttall, 1910)'nin yayılışının mikroskopik ve serolojik yöntemlerle araştırılması, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ 2004.
32. Mehlhorn H. Encyclopedia of Parasitology, 3rd Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2008: 1573.
33. Piroplasmosis. Report from 8th Int Conf Eq Inf Dis Babesiosis. <http://www.neosoft.com/iaep/pages/edwatch/piroplasmosis.html>. Erişim Tarihi: 15.10.2012.
34. Mc Cosker JP. The global importance of babesiosis. In: Babesiosis, Edits: Ristic M, Kreier JP. Academic pres, New York. 1981: p 1-24.
35. Schein E. Equine Babesiosis, In: Babesiosis of Domestic Animals and Man. Miodrag Ristic Edt. CRC Press, Inc Florida, USA 1988: p197-208.
36. Sayın F, Dumanlı N. Elazığ bölgesinde evcil hayvanlarda görülen kene (Ixodidae) türleri ile ilgili epizootiyolojik araştırmalar. AÜ Vet Fak Derg 1982; 29 (3-4): 344-362.
37. Brünig A, Phipps P, Posnett E, Canning EU. Monoclonal antibodies against *Babesia caballi* and *Babesia equi* and their application in serodiagnosis. Vet Parasitol 1997; 68: 11-26.
38. Frerichs WM, Holbrook AA, Johnson AJ. Equine piroplasmosis: Production of Antigens for the Complement Fixation Test. Am J Vet Res 1969; 30: 1337-1341.
39. Knowles RC, Mathis RM, Bryant JE, Willers KH. Equine piroplasmosis. J Am Vet Med Ass 1966; 148: 407-410.
40. Sippel WL, Cooperrider DE, Gainer JH, et al. Equine piroplasmosis in the United States. J Am Vet Med Ass 1962; 141: 694-698.
41. Scoles GA, Hutcheson HJ, Schlater JL, et al. Equine Piroplasmosis Associated with *Amblyomma cajennense* Ticks, Texas, USA. Emerg Infect Dis 2011 October; 17: 1903-1905.

42. Short MA, Clark CK, Harvey JW, et al. Outbreak of equine piroplasmosis in Florida. J Am Vet Med Assoc 2012 Mar; 240: 588-595.
43. Friedhoff VKT. Die piroplasmen der Equiden- Bedeutung für den internationalen Pferdeverkehr. Berl Münch Tierarztl Eschr 1982; 95: 368-374.
44. Kumar S, Kumar Y, Malhotra DV, Dhar S, Nichani AK. Standardisation and comparison of serial dilution and single dilution enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using different antigenic preparations of the *Babesia (Theileria) equi* parasite. Vet Res 2003; 34: 71-83.
45. Barnett SF. Babesia of horses in Britain. Vet Rec 1974; 95: 346-347.
46. Joyner LP, Donnelly J, Huck RA. Complement fixation tests for equine piroplasmosis (*Babesia equi* and *B. caballi*) performed in the UK during 1976 to 1979. Equine Vet J 1981; 13:103-6.
47. Mahoney DF, Wright IG, Fercichs WM, et al. The Identification of *Babesia equi* in Australia. Aust Vet J 1977; 53: 461-464.
48. Shkap V, Cohen I, Leibovitz B, et al. Seropravalence of *Babesia equi* Among Horses in Israel Using Competitive Inhibition ELISA and IF A Assays. Vet Parasitol 1998; 76: 251-259.
49. Xuan X, Nagai A, Battsetseg B, et al. Diagnosis of Equine Piroplasmosis in Brazil by Serodiagnostic Methods with Recombinant Antigens. J Vet Med Sci 2001; 63: 1159-1160.
50. Zwegarth E, Lopez-Roballar LM, Nurton J, Guthrie AJ. Culture isolation and propagation of *Babesia caballi* from naturally infected horses. Parasitol Res 2002; 88: 460-462.
51. Boldbaatar D, Xuan X, Battsetseg B, et al. Epidemiological Study of Equine Piroplasmosis in Mongoli. Vet Parasitol 2005; 27: 35-38.
52. Xu Y, Zhang S, Huang X, et al. Seroepidemiologic Studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* Infections in Horses in Jilin Province of China, J Vet Med Sci 2003; 65: 1015-1017.
53. García-Bocanegra I, Arenas-Montes A, Hernández E, et al. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids, 2012 (In Press).
54. Leblond A, Pradier S, Pitel PH, et al. An epidemiological survey of equine anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*) in southern France. Rev Sci Tech 2005 Dec; 24: 899-908.
55. Grandi G, Molinari G, Tittarelli M, Sasseria D, Kramer LH. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* Infection in Horses from Northern Italy. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 2011 July; 11: 955-956.
56. Seo MG, Yun SH, Choi SK, et al. Seroprevalence of equine piroplasms in the Republic of Korea. Vet Parasitol 2011 Jun 30;179:224-226.

57. Heim A, Passos LM, Ribeiro MF, et al. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. *Parasitol Res* 2007 Dec; 102: 63-8.
58. Kerber CE, Labruna MB, Ferreira F, et al. Prevalence of equine Piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil *Rev Bras Parasitol Vet* 2009 Oct-Dec; 18: 1-8.
59. Adaszek L, Górna M, Krzysiak M, et al. Identification of the piroplasms isolated from horses with clinical piroplasmosis in Poland. *Wiadomooci Parazytologiczne* 2011; 57: 21–26.
60. Bhoora R, Quan M, Franssen L, et al. Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. *Vet Parasitol* 2010; 168: 201-11.
61. Jaffer O, Abdishakur F, Hakimuddin F, et al. A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Parasitol Res* 2010; 106:709–713.
62. Kouam MK, Kantzoura V, Gajadhar AA, et al. Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece. *Vet Parasitol* 2010 May; 169: 273–278.
63. Sagunay RA. Çanakkale-Kumkale çayırlarında beygir sıtması arakonakçısı. *As Vet Mec* 1946; 24: 32-36.
64. Sagunay RA. Protozooloji yönünden atların paraziter hastalıkları. Genkur, Baş. 1 nolu Basımevi, Ankara. 1951.
65. Nartman H, Pınar C, Erdin B. Manisa birlik hayvanlarında 1952 ve 1953 yıllarında görülen piroplazmoz olayları. *Askeri Vet Derg* 1954; 32: 31-47.
66. Afşin M, 1955. Ordumuz hayvanlarında hüküm süren piroplazmoz nevileri ve şimdiye kadar tedaviden alınan sonuçlar. *M M V As Vet Ens, Tez*.
67. Yaşarol Ş. Yurdumuz atlarında *Piroplasma caballi* ve *Nutallia equi* enfeksiyonlarına dair ihzari bilgi. *Türk Vet Hek Dern Derg* 1955; 24: 2007-2008.
68. Özcan CH. Ankara ve civarında evcil hayvanlarda görülen Piroplasmose vakaları ve tedavileri üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Basımevi* 1961: pp. 10-106.
69. Alibaşoğlu M, Yalçın Ş. 1933-1961 yılları arasında Ankara ve yöresinde atlarda görülen hastalıklara toplu bir bakış. *A Ü Vet Fak Derg* 1965; 12: 98-111.
70. İnci A. Kayseri yöresinde tek tırnaklılarda *Babesia equi* (Laveran, 1901) ve *Babesia caballi* (Nuttall, 1910) yaygınlığının mikroskopik muayeneyle araştırılması. *FÜ Sağ Bil Derg* 2002; 16: 85-88.

71. Aktaş M, Dumanlı N. Malatya Sultansuyu Tarım İşletmesi atlarında subklinik *Babesia equi* (Laveran, 1901) ve *Babesia caballi* (Nuttall, 1910) enfeksiyonları. T Parazitol Derg. 2000; 24: 55-56.
72. Akkan HA, Karaca M, Tütüncü M, ve ark. Serologic and Microscopic Studies on Babesiosis in Horses in The Eastern Border of Turkey. J Equine Vet Sci 2003; 23: 181-183.
73. Erdoğan SZ. Marmara ve Ege Bölgesinde Atlarda *Babesia equi* (Laveran, 1901) ve *Babesia caballi* (Nuttall, 1910)'nin Yayılışının Serolojik Yöntemlerle Araştırılması, 14. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 18-25 Eylül 2005, İzmir.
74. Öncel T, Vural G, Gıcık Y, Arslan MO. Kars Yöresinde Atlarda *Babesia (Theileria) equi*'nin (Laveran, 1901) Seropozitifliği. Türkiye Parazitol Derg 2007; 31: 170-172.
75. Balkaya İ, Erdoğan Z. Investigation of prevalence of *Babesia equi* (Laveran, 1901) and *Babesia caballi* (Nuttall, 1910) in horses by serological methods in Elazığ and Malatya province. FÜ Sağlık Bil Derg 2006; 20: 61-63.
76. Balkaya İ, Erdoğan Z. Prevalance of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horses by serological methods in the Mediterranean Sea and the Black Sea regions of Turkey. J Aim Vet Advanc. 2006; 5: 168-171.
77. Deniz A, Pişkin Ç, Balkaya İ, Dünder B. Türkiye'de atlarda *Babesia caballi* ve *Theileria equi*'nin seroprevalansı, 15. Ulusal Parazitoloji Kongresi, s 164, 18-23 Kasım 2007, Kayseri,
78. Sevinç F, Maden M, Kumaş C, Sevinç M, Ekici ÖD. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. Vet Parasitol 2008; 156: 173-177.
79. Açııcı M, Umur Ş, Güvenç T, Arslan HH, Kurt M. Seroprevalance of equine babesiosis in the Black Sea region of Turkey. Parasitol Inter 2008; 57: 198-200.
80. Karatepe B, Karatepe M, Çakmak A, Karaer Z, Ergün G. Investigation of seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Nigde province, Turkey. Trop Anim Health Prod 2008; 41: 109-113.
81. Sarı B, Kırmızıgül AH, Deniz A, Taşçı GT. Kars ve Ardahan Yöresinde Kış Mevsiminde Atlarda *Babesia caballi* ve *Theileria equi* 'nin Seroprevalansı. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2010;16: 657-661.
82. Kurt C, Yaman M. Adana Yöresi Atlarında *Babesia equi* ve *Babesia caballi*'nin Yayılışının Mikroskopik ve Serolojik (cELISA) Yöntemlerle Araştırılması. YYU Vetr Fak Derg 2012; 23: 1-4.

83. Deniz A, Pişkin FÇ, Balkaya İ ve ark. Türkiye’de Atlarda *Babesia* Etkenlerinin Saptanmasında PCR Tekniğinin Uygulanması. T.C. Tarım Ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Hayvan Sağlığı Araştırmaları Program Değerlendirme Toplantısı, s 186-200, 25-28 Şubat 2008, Antalya.
84. Balkaya İ. Türkiye’nin farklı bölgelerinde atlarda *Babesia equi* (Laveran, 1901) ve *Babesia caballi* (Nuttall, 1910)’nin yayılışının mikroskopik ve serolojik yöntemlerle araştırılması, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ 2004.
85. Kolabskii N, Gaidukov AK. Lowering the virulence of *Nuttallia equi*. Vet Bull 1957; 29: 181-182.
86. Georges K, Ezeokoli CD, Sparagano O, et al. A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. Vet Parasitol 2011; 175: 363-366.
87. Bashuriddin JB, Cama C, Rebelo E. Molecular Detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Horses Blood by PCR Amplification of Part of the 16S rRNA Gen. Vet Parasitol 1999; 84: 75-83.
88. Tamaki Y, Hirata H, Takabatake N, et al. Molecular Cloning of *Babesia caballi* Gene Encoding the 134-kd Protein and Evaluation of Its Diagnostic Potential in an ELISA, Clin Diagn Lab Immunol Jan 2004; 11: 211-215.
89. Hailat NQ, Lafi SQ, Al-Darraji AM, Al-Ani FK. Equine Babesiosis Associated With Strenuous Exercise: Clinical and Pathological Studies in Jordan, Vet Parasitol 1997; 69: 1-8.
90. (2008) Equine Piroplasmosis. Center for Food Security and Public Health. <http://www.cfsph.iastate.edu>. Erişim tarihi: 02.09.2008.
91. Holman PJ, Becu T, Bakos E, et al. B. equi Field Isolates Cultured from Horse Blood Using a Microcentrifuge Method, J Parasitol 1998; 84: 696-699.
92. Dede S, Değer Y, Değer S, Tanritanir P. Plasma levels of zinc, copper, copper/zinc ratio, and activity of carbonic anhydrase in equine piroplasmosis. Biol Trace Elem Res 2000; 125(1): 41-5.
93. Allen PC, Frerichs WM, Holdbrook AA. Experimental acute *Babesia caballi* infections II Response of platelets and fibrinogen. Exp. Parasitol 1975; 37: 373-9.
94. Allen PC, Frerichs WM, Holdbrook AA. Experimental acute *Babesia caballi* infections I Red blood cell dynamics. Exp. Parasitol 1975; 37: 67-77.
95. Homer MJ, Deflin Al, Telford III RS, Krause PJ, Persing DH. Babesiosis. Amer Soc Microbiol 2000; 13: 451-469.
96. Levy MG, Clabaugh G, Ristic M. Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. Infect Immun. 1982; 37: 1127-1131.

97. Tait A, Hall FR. Theileria annulata: Control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines. Rev Sci Tech 1990; 9: 387-403.
98. Boulter N, Hall R. Immunity and vaccine development in the bovine theileriosis. Adv Parasitol 1999; 44: 41-97.
99. Ahmed JS, Mehlhorn H. The cellular basis of the immunity to and immunopathogenesis of tropical theileriosis. Parasitol Res 1999; 85: 539-549.
100. Du Toit PJ. Experimentelle Studien über die Perdepiroplasmose. Arch. Schiffs Trop. Hyg. 1919; 23: 141.
101. Kaya G. Parazitoloji Temel İlkeler ve Laboratuvar Teknikleri. Antakya, MKÜ Vet Fak Yayın. 2003: No16/1.
102. Moltmann UG, Mehlhorn H, Schein E, et al. Fine Structure *B. equi* within Lymphocytes and Erythrocytes of Horses: An In vivo and In vitro Study. J Parasitol 1983; 69:111-120.
103. Nicolaiewsky TB, Richter MF, Lunge VR, et al. Detection of *Babesia equi* by Nested PCR, Vet Parasitol 2001; 101: 9-21.
104. Xuan X, Igarashi I, Tanaka T, et al. Detection of Antibodies to *Babesia equi* in Horses by Latex Agglutination Test Using Recombinant EMA-1. Clin Diagn Lab Immunol. 2001 May; 8:645-6.
105. Equine Piroplasmosis, OIE Terrestrial Manual 2008. Erişim: <http://www.oie.int>. Erişim tarihi: 28.10.2012.
106. Kumar S, Malhotra DV, Dhar S, Nichani AK. Vaccination of Donkeys Against *Babesia equi* Using Killed Merozoite immunogen, Vet Parasitol 2002 May 30; 106: 19-33.
107. Xuan X, Larsen A, Ikadai H, et al. Expression of *Babesia equi* Merozoite Antigen 1 in Insect Cells by Recombinant Baculovirus and Evaluation of Its Diagnostic Potential ELISA. J. Clin. Microb. 2001; 39: 705-709.
108. Kim C, Alhassan A, Verdida RA, et al. Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis. Vet Parasitol 2007; 148: 137-143.
109. Posnett ES, Fehrsten J, De Waal DT, Ambrosio RE. Detection of *Babesia equi* in infected horses and carrier animals using a DNA probe. Vet. Parasitol 1991; 39: 19-32.
110. Rampersad J, Cesar E, Campbell MD, Samlal M, Ammons D. A field evaluation of PCR for routine detection of *Babesia equi* in horses. Veterinary Parasitology 2003; 114: 81-87.
111. Alhassan A, Pumidonming W, Okamura M et al. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. Vet Parasitol 2005; 129: 43-49.

112. Rüegg SR, Torgerson P, Deplazes P, Mathis A. Age-dependent dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or PCR prevalence data from domestic horses and ticks. *Parasitology* 2007; 134: 939-947.
113. Kim C, Blanco LBC, Alhassan A, et al. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Veterinary Parasitology* 2008; 151: 158–163.
114. Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2006 Apr 30;137: 214-21.
115. Galluzzi L, Penna A, Bertozzini E, et al. Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Alexandrium minutum* (a Dinoflagellate). *Appl Environ Microbiol* 2004 Feb; 70:1199-206.
116. Kuttler KL, Gipson CA, Goff WL, Johnson LW. Experimental *Babesia equi* infection in mature horses. *Am J Vet Res* 1986; 47: 1668-1670.
117. Rashid HB, Chaudhry M, Rashid H, et al. Comparative efficacy of diminazene diaceturate and diminazene aceturate for the treatment of babesiosis in horses. *Trop Anim Health Prod* 2008; 40: 463-467.
118. McDougald LR, Roberson EL. Antiprotozoan Drugs. In: Booth NH, McDonald LE. eds. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 6. Edition. Iowa State University Press. Ames, 1988: p.950-968.
119. Lindsay DS, Blackburn BL. Antiprotozoan Drugs. In: Adams HR. ed. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Eighth Edition. Iowa State University Press. Ames, 2001: p 992- 1016.
120. Sloboda M, Jirku M, Lukešová D, et al. A survey for piroplasmids in horses and Bactrian camels in North-Eastern Mongolia. *Vet Parasitol* 2011 Jun 30;179:246-9.
121. Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999; 41: 95-98
122. Drummond AJ, Ashton B, Buxton S. Geneious v5.5, Available from <http://www.geneious.com>.
123. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Mol. Biol Evol* 2011; 28: 2731-2739.
124. Albayrak AS, Eroğlu A, Kalaycı Ş, ve ark. Güvenirlilik Analizi. Kalaycı Ş (ed), *SPSS Uygulamalı Çok Değişkenli İstatistik Teknikleri*. Asil yayın dağıtım, Ankara 2005.
125. Uilenberg G. Babesia—a historical overview. *Vet. Parasitol* 2006;138: 3-10.

126. Nagore D, Garcia-Sanmartin J, Garcia-perez AL, Juste RA, Hurtado A. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. Vet. Parasitol 2004; 123: 41–54.
127. Bhoora R, Franssen L, Oosthuizen MC, et al. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. Vet. Parasitol 2009; 159: 112–120.
128. Hornok S, Edelhofer R, Földvári G, Joachim A, Farkas R. Serological evidence for *Babesia canis* infection of horses and an endemic focus of *B. caballi* in Hungary. Acta Vet Hung. 2007 Dec; 55:491-500.
129. Criado A, Martinez J, Buling A, et al. New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. Vet Parasitol 2006 Dec 20;142:238-47.
130. Friedhoff KT, Tenter AM, Müller I. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. Rev Sci Tech. 1990 Dec; 9:1187-94.
131. Baldani CD, Machado RZ, Botteon PTL, Takakura FL, Massard CL. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against *Babesia equi* in horses. Cienc. Rural 2004; 34: 1525–1529.
132. Ogunremi O, Halbert G, Mainar-Jaime R, et al. Accuracy of an indirect fluorescent-antibody test and complement-fixation test for the diagnosis of *Babesia caballi* in field samples from horses. Prev Vet Med. 2008 Jan; 83:41-51.
133. Machado RZ, Toledo CZ, Teixeira MC, et al. Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in donkeys (*Equus asinus*) in Brazil. Vet Parasitol. 2012 May 25;186:461-5.
134. Gubbels JM, de Vos AP, van der Weide M, et al. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. J Clin Microbiol. 1999 Jun; 37:1782-1789.
135. Gubbels MJ, Hong Y, van der Weide M, et al. Molecular characterization of the *Theileria buffeli/orientalis* group. Int J Parasitol. 2000 Jul; 30:943-52.
136. Adam RD, Ortega YR, Gilman RH, Sterling CR. Intervening transcribed spacer region 1 variability in *Cyclospora cayentanensis*. J Clin Microbiol. 2000 Jun; 38:2339-43.
137. Stockham SL, Kjemtrup AM, Conrad PA, et al. Theileriosis in a Missouri beef herd caused by *Theileria buffeli*: case report, herd investigation, ultrastructure, phylogenetic analysis and experimental transmission. Vet Pathol. 2000 Jan; 37:11-21.
138. Cossio-Bayugar R, Pillars R, Schlater J, Holman PJ. *Theileria buffeli* infection of a Michigan cow confirmed by small subunit ribosomal RNA gene analysis. Vet Parasitol. 2002 Apr 30; 105:105-110.

139. Salim B, Bakheit MA, Kamau J, Nakamura I, Sugimoto C. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene within *Theileria equi* from horses in Sudan. Parasitol Res. 2010 Jan;106: 493-8.
140. Chae J, Lee J, Kwon O, et al. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene variable (V4) region among and within geographic isolates of *Theileria* from cattle, elk & white-tailed deer. Vet Parasitol 1998 Feb 15; 75:41-52.
141. Chae JS, Waghela SD, Craig TM, et al. Two *Theileria cervi* SSU rRNA gene sequence types found in isolates from white-tailed deer and elk in North America. J Wildl Dis. 1999 Jul;35: 458-65.
142. Katzer F, McKellar S, Kirvar E, Shiels B. Phylogenetic analysis of *Theileria* and *Babesia equi* in relation to the establishment of parasite populations within novel host species and the development of diagnostic tests. Mol Biochem Parasitol 1998 Sep 1;95: 33-44.

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ DENEY HAYVANLARI
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

ETİK KURULUN ADRESİ : Erciyes Üniversitesi

Tarih: 09/12/2009

Toplantı Sayısı: 12

Karar No: 09/66

Etik kurul toplantısı

09/12/2009

tarihinde Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik

Kurul Başkanlığı'nda

Pro. Dr. Zübeyde GÜNDÜZ

başkanlığında gerçekleştirilmiştir.

Üye Adı/Soyadı	Akademik Ünvanı	Fakültesi	
Zübeyde Gündüz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Harun Ülger	Doç.Dr.	Tıp Fakültesi	
Özlem Canöz	Doç.Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Doç.Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Servet Kesim	Yard.Doç.Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Davut Bayram	Öğrt.Gör.Dr.	Veteriner Fakültesi	
Coşkun Tez	Doç.Dr.	Fen Edebiyat Fakültesi	
M. Betül Aycan	Yrd. Doç.Dr.	Eczacılık Fakültesi(Farmakoloji)	
Ahmet Öztürk	Öğrt.Gör	Tıp Fakültesi Biyoistatistik	
Serap Altuntaş Eroğlu	Avukat		
Halil Tekiner	Eczacı		

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Alparslan Yıldırım'ın "Bursa Karacabey Yöresinde Atlarda Theileria e ui ve Babesia caballi'nin Real Time PRC ile Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu " adlı araştırması incelenerek, çalışmasının yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

ASLINA KAYITLI

Tarih : 09/12/2009

Etik Kurul Başkanı İmzası

Etik Kurul Başkanı : Pro. Dr. Zübeyde GÜNDÜZ

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Fatih KIZILASLAN

Uyruğu: (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 22 Temmuz 1982, Yozgat

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 536 4627642

email: fatihk82@hotmail.com

Yazışma Adresi: Esertepe Mh 270. Sk. No 11/17 Etlik/ANKARA

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet
Tarihi		
Lisans	Erciyes Ü. Veteriner Fakültesi	2006
Lise	Kayseri Anadolu İmam Hatip Lisesi	2000

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2009-2012	GTHB Rehberlik ve Teftiş Bşk.	Müfettiş Yrd.
2006-2009	TİGEM Karacabey Tarım İş. Md.	Veteriner Hekim

YABANCI DİL

İngilizce