

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

**NEVŞEHİR YÖRESİNDEKİ ATLARDA *STRONGYLUS
VULGARIS*'İN MOLEKÜLER PREVALANSI VE
FİLOGENETİK KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan
Vet. Hek. Mehmet BİLGİN**

**Danışman
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2017
KAYSERİ**

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

**NEVŞEHİR YÖRESİNDEKİ ATLARDA *STRONGYLUS
VULGARIS*'İN MOLEKÜLER PREVALANSI VE
FİLOGENETİK KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan
Vet. Hek. Mehmet BİLGİN**

**Danışman
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2016-6913 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2017
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: Vet. Hek. Mehmet BİLGİN

İmza : 

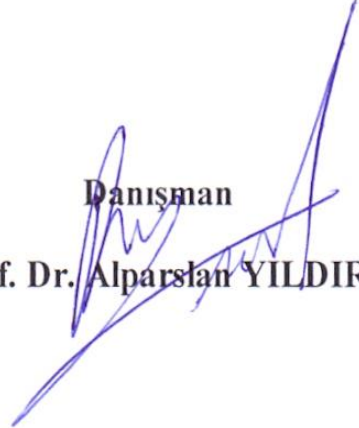
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Nevşehir Yöresindeki Atlarda *Strongylus vulgaris*’in Moleküler Prevalansı ve Filogenetik Karakterizasyonu”, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Tezi Hazırlayan

Vet. Hek. Mehmet BİLGİN



Danışman

Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM



Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM danışmanlığında **Mehmet BİLGİN** tarafından hazırlanan “**Nevşehir Yöresindeki Atlarda *Strongylus vulgaris*’in Moleküler Prevalansı ve Filogenetik Karakterizasyonu**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Parazitoloji** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

23/08/2017

JÜRİ :**İmza**

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

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

Üye : Doç. Dr. G. Zafer PEKMEZCİ (Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

06.09.2017


Prof. Dr. Aykut ÖZDARENELİ**Enstitü Müdürü**

TEŞEKKÜR

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

Parazitoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladığım günden bu yana desteğini gördüğüm değerli hocalarım Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdullah İNCİ'ye, laboratuvar çalışmalarında ve tez çalışması süresince her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim elemanları Doç. Önder DÜZLÜ, Yrd. Doç. Dr. Zuhale ÖNDER ve Araş. Gör. Dr. Arif ÇİLOĞLU'na, çalışma süresince malzeme bazında TYL-2016-6913 kodlu proje ile destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

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

NEVŞEHİR YÖRESİNDEKİ ATLARDA *STRONGYLUS VULGARIS*'İN MOLEKÜLER PREVALANSI VE FİLOGENETİK KARAKTERİZASYONU

Mehmet BİLGİN

**T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2017
Danışman: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

ÖZET

Bu çalışmada Nevşehir yöresindeki atlarda strongyle enfeksiyonlarının ve *S. vulgaris* prevalansının sırasıyla konvansiyonel dışkı muayenesi ve real time PCR yöntemleri ile ortaya çıkarılması ve belirlenen izolatların moleküler karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır. Çalışmada, 2016 yılının Mart-Haziran ayları arasında Nevşehir'in farklı bölgelerindeki çiftliklerde bulunan toplam 150 arap atından tekniğine uygun olarak dışkı örnekleri toplanmıştır. Laboratuvarda dışkı örnekleri strongyle yumurtaları yönünden analiz edilmiş ve pozitif belirlenen örneklerde gram dışkıdaki yumurta sayısı (EPG) belirlenmiştir. Strongyle pozitif örneklerden yüzdürme yöntemi ile yumurta süspansiyonları elde edilmiş ve genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. Örneklerde genomik DNA izolasyon etkinliği rRNA PCR analizleri ile belirlenmiştir. Yumurta pozitif örneklerde *S. vulgaris*'in araştırılması amacıyla ribozomal ITS-2 gen bölgesini hedef alan standart TaqMan prob bazlı ve bu çalışma ile yeni geliştirilen sybergreen tabanlı real time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada incelenen atların 98'inde systrongylid yumurtaları belirlenmiş ve strongyle enfeksiyonlarının prevalansı %65,3 olarak tespit edilmiştir. Yumurta pozitif atlarda ortalama EPG değeri $551,9 \pm 119,9$ bulunmuştur. Her iki real time PCR analizinde strongyle yumurta pozitif 98 atın 19'unun *S. vulgaris* için spesifik amplifikasyon gösterdiği belirlenmiş ve ilgili nematodun moleküler prevalansı %12,7 olarak saptanmıştır. *S. vulgaris* pozitifliği tespit edilen örneklere ait ITS-1/5.8S rRNA ampikonlarından Ct değerlerine göre seçilenler sekans ve filogenetik analizler amacıyla klonlanmıştır. Bu amaçla *S. vulgaris* koloni real time PCR analizleri ile amplifikasyon gösteren ve göstermeyen 10'ar koloni belirlenmiş ve rekombinant plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Rekombinant plazmitlerin sekans analizleri sonucu *S. vulgaris* için iki haplotipin varlığı belirlenmiş ve filogenetik analizler sonucu *S. vulgaris*'in ilgili gen bölgesine göre diğer tüm strongylid türlerden genetik

olarak daha uzak olduğu saptanmıştır. *S. vulgaris* amplifikasyonu göstermeyen rekombinant plazmidlerin sekans analizleri ile Cyathostominae aile altındaki küçük strongyle türlerinden *C. nassatus*, *C. ashworthi* ve *Cy. tetracanthum*'a ait oldukları belirlenmiş ve bu türlere ait haplotiplerin tür bazlı olarak monofiletik küme oluşturdukları görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez atlarda enfeksiyona yol açan strongyle türleri üzerine moleküler veriler sağlanmış ve *S. vulgaris*'in moleküler prevalansı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Strongylus vulgaris*, moleküler prevalans, filogenetik karakterizasyon, at, Nevşehir

**MOLECULAR PREVALENCE AND PHYLOGENETIC
CHARACTERIZATION OF *STRONGYLUS VULGARIS* IN HORSES FROM
NEVSEHIR REGION**

Mehmet BILGIN

**Erciyes University, Graduate School of Health Science
Department of Veterinary Parasitology
M.Sc. Thesis, August 2017
Supervisor: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

ABSTRACT

In this study, it was aimed to reveal the prevalence of strongyle infections and *S. vulgaris* in horses in Nevsehir region by conventional stool examination and real time PCR methods and to perform molecular characterization of the determined isolates. A total of 150 stool specimens from Arabic horses were collected with sutiable technique from the farms located in different regions of Nevşehir in March-June 2016. Fecal samples were analyzed for the strongyle eggs and egg per gram of feces (EPG) values were determined in the egg positive samples in the laboratory. Egg suspensions were obtained from stronglye positive specimens by the flotation technique and genomic DNA isolations were performed. The efficiency of genomic DNA isolation in the samples was determined by rRNA PCR analyzes. A standard TaqMan probe based and a newly developed sybergreen-based real time PCRs both targeted the ribosomal ITS-2 gene region were performed in order to investigate *S. vulgaris* in egg-positive samples. Sytrongylid eggs were detected in 98 of the examined horses in this study and the prevalence of strongyle infections was found to be 65.3%. The average EPG value in egg positive horses was determines as 551.9 ± 119.9 . In both real-time PCR analyzes, 19 out of 98 egg positive horses exhibited specific amplification for *S. vulgaris*, and the molecular prevalence of the related nematode was determined as 12.7%. The amplicons those selected from ITS-1/5.8S rRNA PCR products of *S. vulgaris* positive samples according to Ct values were cloned for sequence and phylogenetic analyzes. For this purpose, each of 10 colonies with and without amplification of *S. vulgaris* DNA by colony real time PCR analysis were selected and recombinant plasmid purifications were performed. Sequence analysis of recombinant plasmids revealed the presence of two haplotypes for *S. vulgaris*, and according to the phylogenetic analysis of the related gene region it was found that *S. vulgaris* was genetically more distant from all other strongylid species. According to

sequence analysis, the recombinant plasmids without *S. vulgaris* amplification were identified as *C. nassatus*, *C. ashworthi* and *Cy. tetracanthum*, and haplotypes of these species formed monophyletic cluster.

In conclusion, this study provided the first molecular data on strongyle species that causes infection in horses in Turkey and the molecular prevalence of *S. vulgaris* was determined.

Key words: *Strongylus vulgaris*, molecular prevalence, phylogenetic characterization, horse, Nevsehir

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	x
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE NEMATODLARIN TAKSONOMİSİ	3
2.2 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE NEMATODLARIN MORFOLOJİSİ .	5
2.2.1 Strongylinae.....	5
2.2.2 Cyathostominae	6
2.3 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE NEMATODLARIN BİYOLOJİSİ.....	7
2.3.1 <i>Strongylus</i> spp.	7
2.3.2 Cyathostominae	9
2.4 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE NEMATODLARIN EPİDEMİYOLOJİSİ.....	11
2.5 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE NEMATODLARIN PREVALANSI	12
2.6 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE NEMATODLARIN KLİNİK VE PATOGENEZİ.....	13
2.6.1 <i>Strongylus vulgaris</i>	13

2.6.2	Cyathostominae	14
2.7	TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE ENFEKSYONLARINA KARŞI İMMUNİTE	15
2.8	TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE ENFEKSYONLARININ TEŞHİSİ ..	17
2.9	TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE ENFEKSYONLARININ TEDAVİ VE KONTROLÜ	19
2.10	TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE ENFEKSYONLARINDA ANTHELMİNTİK DİRENÇLİLİĞİ	22
2.10.1	Tanımlar	23
2.10.2	Direnç Mekanizması.....	23
2.10.3	Direnç için Seleksiyon.....	24
2.10.4	Dirençliliğin Saptanması	25
2.10.5	At Strongylidlerinde Dirençlilik Durumu	27
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1	SAHA ÇALIŞMALARI	28
3.1.1	Araştırma Sahası ve Dışkı Örneklerinin Toplanması.....	28
3.2	LABORATUVAR ÇALIŞMALARI	29
3.2.1	Konvansiyonel Dışkı Muayenesi.....	29
3.2.2	Gram Dışkıdaki Yumurta Sayısının (EPG) Belirlenmesi.....	29
3.3	MOLEKÜLER ANALİZLER	30
3.3.1	Strongyle Pozitif Örneklerde Yumurta Süspansiyonlarından Genomik DNA İzolasyonu	30
3.3.2	Ribosomal RNA Internal Transcribed Spacer (ITS)-1, 5.8S, ITS-2 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	32
3.3.3	Real Time PCR Analizleri.....	33
3.3.4	Klonlanma ve Plazmid Pürifikasyonu	36
3.3.5	Sekans ve Filogenetik Analizler	38

3.4 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	39
4. BULGULAR	41
4.1 KONVANSİYONEL DIŞKI MUAYENESİ SONUÇLARI	41
4.2 GRAM DIŞKIDAKİ YUMURTA SAYISI (EPG) VE İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	43
4.3 MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI	47
4.3.1 <i>S. vulgaris</i> Real Time PCR Analiz Sonuçları.....	47
4.3.2 Ribozomal ITS-1, 5.8S, ITS-2 Gen Bölgesinin Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları.....	51
4.3.3 Filogenetik Analiz Sonuçları.....	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	58
6. KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	87

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 Atlardaki strongyle nematodların sistematikteki yeri.....	4
Tablo 3.1 Nevşehir yöresinde örneklenen atların yaş grupları, cinsiyet ve ırklarına göre dağılımları	29
Tablo 3.2 <i>S. vulgaris</i> ITS-2 gen bölgesinden dizayn edilen Sybergreen real time PCR için primer sekansları ve özellikleri.....	34
Tablo 4.1 Strongylid yumurtaları ile pozitif belirlenen atların yaş ve cinsiyete göre dağılımları	41
Tablo 4.2 Yaş gruplarına göre strongylid yumurta pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)	42
Tablo 4.3 Atların cinsiyetine göre strongylid yumurta pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20).....	42
Tablo 4.4 Strongylid yumurtaları ile pozitif belirlenen atlarda EPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımı	44
Tablo 4.5 Atlarda EPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımının istatistiksel analizi	45
Tablo 4.6 Strongylid yumurtaları ile pozitif belirlenen atlarda EPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımı	46
Tablo 4.7 Atlarda EPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımının istatistiksel analizi	46
Tablo 4.8 <i>S. vulgaris</i> yönünden Real Time PCR analizleri ile pozitif belirlenen atların yaş gruplarına göre prevalansı	50
Tablo 4.9 Yaş gruplarına göre <i>S. vulgaris</i> prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20) .	50
Tablo 4.10 Moleküler karakterizasyonları yapılan strongyle türlerinde belirlenen haplotipler	53
Tablo 4.11 Moleküler karakterizasyonları yapılan strongyle türlerine ait haplotipler arasındaki ikili hizalama identiklik oranları.....	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 <i>Coronocyclus coronatus</i> 'un baş kısmı	5
Şekil 2.2 <i>Strongylus</i> soyundaki türler	6
Şekil 2.3 <i>Strongylus</i> spp. baş kısımları, yandan görünüş.. ..	6
Şekil 2.4 <i>Cyathostomum coronatum</i> baş kısımları.....	7
Şekil 2.5 <i>S. vulgaris</i> 'in biyolojik döngüsü.....	8
Şekil 2.6 Bağırsak mukozası içinde ankiste <i>Cyathostomum</i> dördüncü dönem larva (A); Mukozadan bağırsak lümenine giren L4 (B)	10
Şekil 2.7 <i>S. vulgaris</i> (sv) ve <i>Cyathostomum</i> ların (cyath) L3'ü (a); strongil yumurtası (b).....	18
Şekil 3.1 Örneklemesi yapılan atların bulunduğu çiftliklerin Nevşehir ilindeki lokalizasyonları.....	28
Şekil 3.2 <i>S. vulgaris</i> ITS-2 gen bölgesinden dizayn edilen sybergreen real time PCR için primer çifti, bağlanma spesifiteleri ve özellikleri	35
Şekil 4.1 Dışkı örneklerinde belirlenen strongylid yumurtaları	41
Şekil 4.2 Atların yaş gruplarına göre strongylid yumurta pozitifliğinin dağılımı	41
Şekil 4.3 Atların cinsiyetine göre strongylid yumurta pozitifliğinin dağılımı.....	42
Şekil 4.4 Dışkı örneklerinde belirlenen <i>P. equorum</i> yumurtaları.....	43
Şekil 4.5 McMaster sayım kamerasında belirlenen strongylid yumurtaları	44
Şekil 4.6 EPG değerlerinin atların yaş gruplarına göre dağılım grafiği	45
Şekil 4.7 EPG değerlerinin atların cinsiyetine göre dağılım grafiği.....	46
Şekil 4.8 TaqMan Real Time PCR'da <i>S. vulgaris</i> için belirlenen amplifikasyon eğrileri.....	47
Şekil 4.9 Sybergreen Real Time PCR'da <i>S. vulgaris</i> için belirlenen amplifikasyon eğrileri	47
Şekil 4.10 Sybergreen Real Time PCR ürünlerinin jel elektroforezde görünümü	48
Şekil 4.11 Amplifikasyon etkinliği açısından Sybergreen ve TaqMan Real Time PCR'da aynı örnekler (a, b, c) için belirlenen amplifikasyon eğrileri.....	48
Şekil 4.12 Sybergreen Real Time PCR'da erime eğrisi analizlerinde <i>S. vulgaris</i> nesillerine ait izolatlar için belirlenen spesifik erime ısıları.	49
Şekil 4.13 Sybergreen Real Time PCR'da <i>S. vulgaris</i> linearize plazmid DNA izolatu ile oluşturulan standart eğri ve etkinlik oranı	49
Şekil 4.14 Atların yaş gruplarına göre <i>S. vulgaris</i> 'in moleküler prevalansı.....	50

Şekil 4.15 Strongylid yumurta süspansiyonlarından elde edilmiş genomik DNA izolatlarının ITS-1, 5.8S, ITS-2 bölgesini hedef alan primerlerle PCR'ı sonucu belirlenen amplikonların jel elektroforezde görünümü	51
Şekil 4.16 LB katı besiyerinde üreyen koloniler.....	52
Şekil 4.17 Çalışmada karakterize edilen <i>S. vulgaris</i> ve diğer strongyle türlerine ait izolatların ITS-1, 5.8S, ITS-2 bölgesi nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları	54
Şekil 4.18 Strongyle izolatlarının ITS-1, 5.8S, ITS-2 gen bölgesi BI ve ML analizlerine göre filogenetik ilişkileri... ..	57

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gastro-intestinal parazitler otlayan atlarda oldukça sık görülmekte olup bunlar arasında cyathostominler (küçük strongyler), *Parascaris equorum*, *Anoplocephala perfoliata* ve *Strongylus vulgaris* en önemli helmintler olarak ortaya çıkmaktadır. Tüm bu helmintler gelişme geriliği, ağırlık kaybı ve klinik hastalıkla birebir ilişkilidir (1-3). Neticede anthelmintik ilaçların düzenli kullanımı temelinde parazit kontrol programlarının geliştirilmesiyle bu parazitlerin kontrolü açısından yoğun girişimler yapılmaktadır (4-6). *Strongylus vulgaris* atları enfekte eden bu gastro-intestinal parazitler arasında en patojenik olanıdır ve kontrol programlarında hedef alınan en önemli türdür (1, 7, 8). *S. vulgaris* enfeksiyonları için etkin bir risk analizi ve seçilen tedavi yönteminin etkinlik değerlendirilmesinde özgün ve duyarlılığı yüksek teşhis yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır. Bu açıdan yaygın kullanılan teknik olan dışkı yumurta sayımı (EPG), zaman alıcı olması, tür identifikasyonuna imkan sağlamaması ve larva kültürüne ve uzman personele gereksinim duyması gibi dezavantajlara sahiptir (1, 9). Teknolojik gelişimin bir sonucu olarak DNA tabanlı teşhis araçları özellikle son on yıl içerisinde evcil hayvanlarda özellikle ruminantlarda çeşitli parazitik nematod türlerinin identifikasyonunda da başarıyla kullanılmış (10, 11) ve neticesinde epidemiyolojik ve ilaç dirençliliği araştırmalarında daha özgün verilerin sağlanmasına büyük katkıda bulunmuştur. Paralel olarak atlarda *S. vulgaris* enfeksiyonlarının kantitatif moleküler identifikasyonu amacıyla ribozomal internal transcribed spacer 2 (ITS-2) gen bölgesini hedef alan primer ve problarla Real Time PCR tekniği kullanılarak sınırlı sayıda araştırmaların yapıldığı görülmekte olup (12-14) ilgili çalışmalarda özellikle surveiliens ve ilaç dirençliliğinin kontrolü ve takibinde etkin bir yöntem olduğunun altı çizilmiştir.

Türkiye’de günümüze kadar atların strongyle enfeksiyonları üzerine yapılan sınırlı sayıdaki araştırmaların konvansiyonel dışkı muayenesi, larva kültürü ve nekropsi analizleri temelinde prevalans çalışmaları tarzında olduğu görülmekte olup moleküler identifikasyon ve genotipleme çalışmaları bulunmamaktadır. Moleküler epidemiyoloji

kapsamında bu parazite ait popölasyonların genetik çeşitliliklerinin ortaya çıkarılması ve farklı coğrafyalardaki nesilleriyle akrabalık ilişki ve düzeylerinin belirlenmesi bilimsel açıdan önem arz etmekte olup özellikle anthelmintik dirençliliği de göz önüne alındığında kontrol ve mücadele stratejilerinin belirlenmesinde tüm Dünyada olduğu gibi ülkemiz için de oldukça önemlidir. Bu tez çalışması ile Nevşehir yöresinde yetiştiriciliği yapılan atlarda *S. vulgaris*'in moleküler identifikasyonu ve prevalansı standart ve yeni geliştirilen kantitatif Real Time PCR teknikleriyle araştırılmış ve risk faktörleri açısından moleküler epidemiyolojik veriler elde edilmiştir. *S. vulgaris* ve diğer strongyle türleri ile enfekte belirlenen atlarda parazit popölasyonlarına ait nesillerden izole edilmiş genomik DNA izolatlarının ribozomal ITS1/5.8S/ITS-2 gen bölgeleri amplifiye edilerek, klonlanmış ve plazmid pürifikasyonları sonrasında sekans analizleriyle moleküler karakterizasyonları sağlanmıştır. İlgili gen bölgesine göre karakterize edilen parazit nesillerinin Dünyada mevcut homologları ve diğer bazı strongyle türleri ile filogenetik yapılanmaları ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar, Türkiye'de atlarda strongyle enfeksiyonları üzerine ilk moleküler filogenetik verileri sağlamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Atlar, Strongylidae ailesinin nematodlarını da içeren çok sayıda gastrointestinal parazit türlerine konaklık yaparlar. Bu parazitler, her ortamda bulunabilir ve erişkinleri tek tırnaklıların kalın bağırsağında yaşar. Strongyle nematodların, şekli ve boyutu ile tür tanımlamasında önemli olan iyi gelişmiş ağız kapsülleri ana karakteristik özellikleridir.

Strongylinae alt ailesinden 15 türün atlarda parazitlendikleri bilinmektedir. *Strongylus edentatus* ve *S. vulgaris* bunlardan en yaygın olanlarıdır (15, 16). Bu türlere ek olarak Cyathostominae alt ailesinde ise atlarda parazitlenen 50'nin üzerinde tür bulunur (17).

S. vulgaris, Strongylinae aile altındaki en patojen türüdür ve tromboembolik kolik olarak bilinen ölümcül bir sendroma neden olur. *S. edentatus* enfeksiyonları ise nadiren patojeniktir (1). *S. vulgaris*'in 25-30 yıl öncesine kadar %80'in üzerinde yaygınlık gösterdiği ve bu özelliği ile parazit kontrolünün birincil hedefi haline geldiği kaydedilmiştir (16).

2.1 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE NEMATODLARIN TAKSONOMİSİ

Tektırnaklıların (at, eşek, zebra) strongyle nematodları, sırasıyla büyük ve küçük strongyller olarak Strongylinae ve Cyathostominae aile altlarında sınıflandırılırlar. Cyathostominae aile altında, atlarda parazitlenen hemen hemen tüm türler Cyathostominae tribüsüne aittir. 2001'de, "cyathostomin" terimini, Cyathostominae tribüsündeki soylar için ortak bir isim olarak kullanma önerisi, "World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology" tarafından kabul edilmiştir (18).

Müller tarafından 1780'de, *Strongylus equinus* ilk strongyle nematod olarak tanımlanmış (19) ve sonraki yüzyılda birkaç strongyle türün tanımlamaları ve adlandırılması

yayınlanmıştır. Lichtenfels (19) tarafından, evcil tektırnaklılarda bulunan strongyle nematodların 56 türü ayrıntılı olarak tanımlanmıştır. O günden bu yana, bu parazitlerin sınıflandırılması modern moleküler tabanlı tekniklerin gelişmesiyle birlikte bazı revizyonlar geçirmiştir. Bu teknikler, türler arasındaki moleküler ilişkiler üzerine yapılan çalışmalar için yeni kapılar aralamıştır. Avustralya (20) ve İngiltere’deki (21) araştırma grupları, halihazırda bulunan iki alt familya arasındaki filogenetik ilişki üzerine çalışmalar yürütmüştür. DNA dizileri karşılaştırıldığında, küçük silindirik ağız kapsülüne sahip soyların muhtemelen büyük ağız kapsülü olanlardan evrimleştiği hipotez edilmiştir (20).

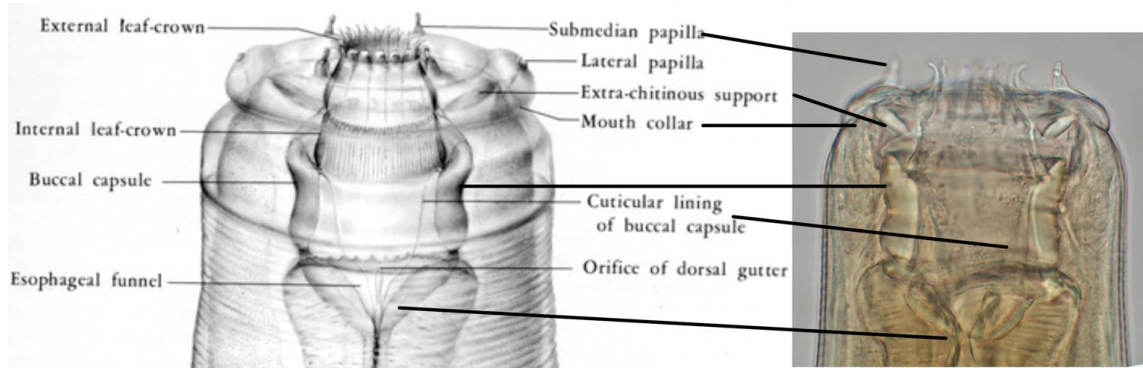
Güncel olarak National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy veri tabanına göre atlardaki strongyle nematodların sistematikteki yeri Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1 Atlardaki strongyle nematodların sistematikteki yeri

Sınıflandırma
Alem: Metazoa
Şube: Nematoda
Sınıf: Chromadorea
Dizi: Rhabditida
Dizialtı: Strongylida
Üst aile: Strongyloidea
Aile: Strongylidae
Alt aile: Strongylinae
Soy: Bidentostomum
Soy: Craterostomum
Soy: Macropicola
Soy: Oesophagodontus
Soy: Parapoteriostomum
Soy: Triodontophorus
Soy: Strongylus
Tür: <i>S. asini</i> <i>S. edentatus</i> <i>S. equinus</i> <i>S. vulgaris</i>
Alt aile: Cyathostominae
Soy: Coronocyclus Cyathostomum Cyclicocyclus Cyclicodontophorus Cyclicostephanus Khalilia Kiluluma Murshidia Petrovinema Poteriostomum Quilonia Skrjabinodentus Tridentoinfundibulum

2.2 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE NEMATODLARIN MORFOLOJİSİ

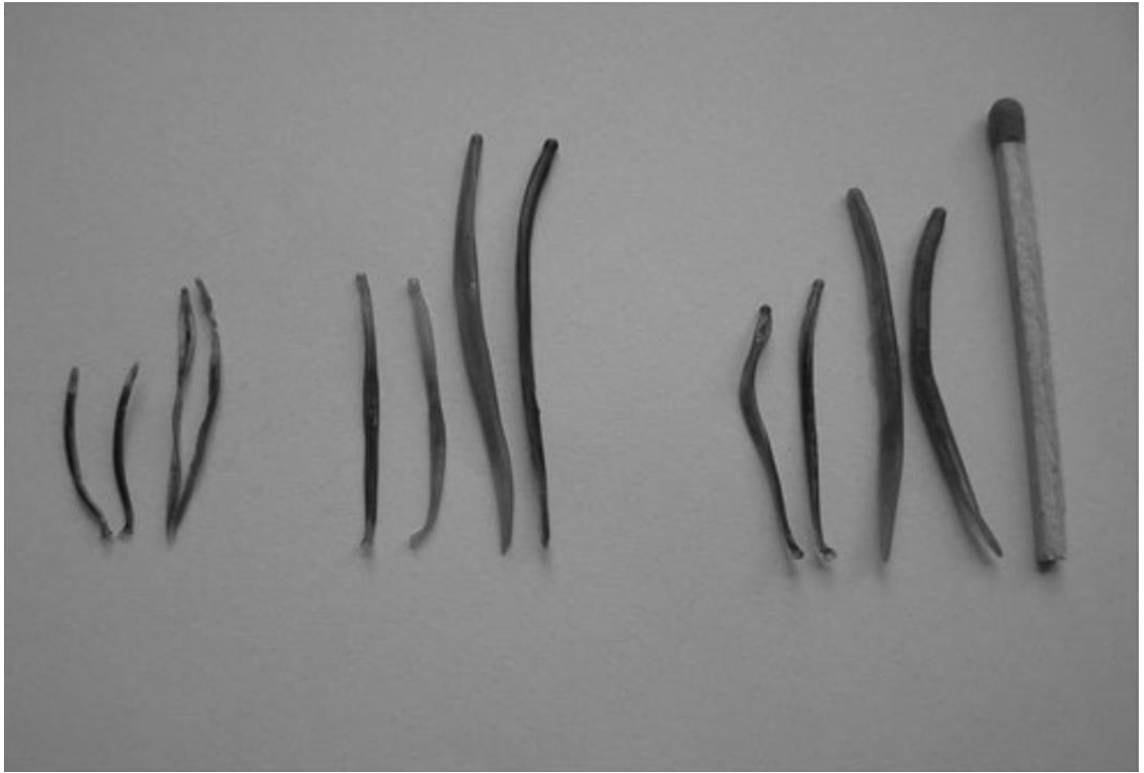
Atların strongyle türlerinin morfolojik farklılaşması, öncelikle ergin nematodların baş kısmının karakteristik özelliklerine dayanır (19) (Şekil 1). Bu nematodlarda ağız kapsülü iyi gelişmiştir. Birçok strongyle nematodun ağız kapsülünde, dorsal oluk olarak adlandırılan ve dorsal olarak uzanan belirgin bir kalınlaşma bulunur. Kütikülün bir parçası olan ağız yakası, ağız açıklığının etrafını çevreler ve bazen bu bölge submedian ve lateral sefalik papiller içerir. Ağız yakasının ön kenarı üzerinde, taç yaprakları olarak adlandırılan papillar yapılar bulunur. Taç yaprakları, iç ve dış olmak üzere iki adettir. Bazı soylar, ağız kapsülünün ön tarafında sklerotize bir halka olan dış taç yaprakları için ekstra-kitinöz destek adı verilen benzersiz bir yapıya sahiptir.



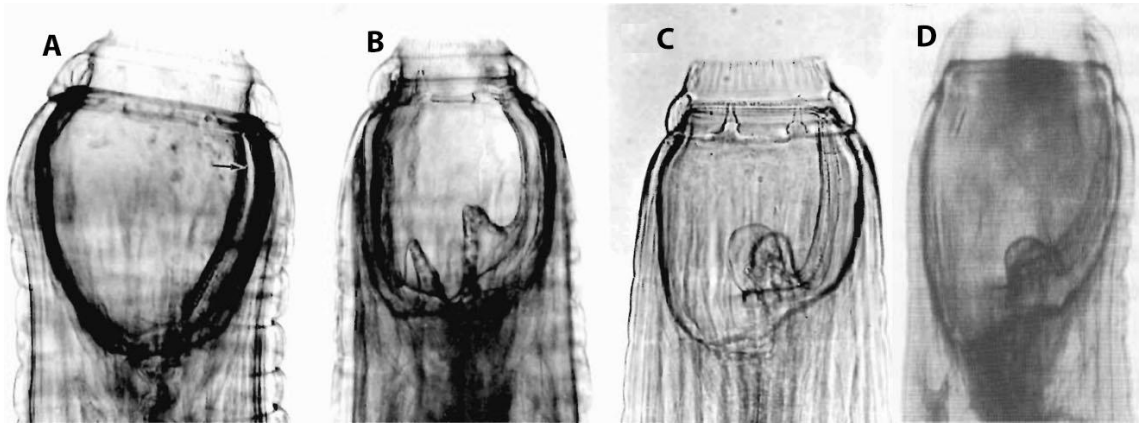
Şekil 2.1 *Coronocylus coronatus*'un baş kısmı (solda şematik çizim, sağda orijinal foto X 200 büyütme) schematic drawing to the left; photo x 200 to the right). Şematik çizimde tür identifikasyonunda önem arz eden özellikler görülmektedir. (19).

2.2.1 Strongylinae

Strongylinae türleri büyük küresel veya huni şeklinde ağız kapsüllerine sahip olup çoğunlukla tabanda diş benzeri yapılar içerirler (Şekil 2.2). Strongylinae alt familyasına dahil olan soylar: Strongylus (Müller, 1780), Oesophagodontus (Railliet & Henry, 1902), Triodontophorus (Looss, 1902), Craterostomum (Boulenger, 1920), Bidentostomum (Tshoijo, 1957); Macropicola (Mawson, 1978) ve Parapoteriostomum'dur (Leiper, 1913). En çok çalışılan soy olan Strongylus soyu, *S. edentatus*, *S. equinus*, *S. vulgaris* ve *S. asini* olmak üzere dört türü kapsar. Bu nematodların uzunluğu 20-45 mm arasında değişir ve oldukça kalındırlar (Şekil 2.2). Ağız kapsülleri globülerdir ve *S. equinus*, *S. vulgaris* ve *S. asini*'de belirgin dişler bulunmaktadır. *S. edentatus*'ta diş bulunmaz (Şekil 2.3).



Şekil 2.2 Strongylus soyundaki türler (Soldan sırasıyla: *S. vulgaris*, *S. equinus*, ve *S. edentatus*) (22)

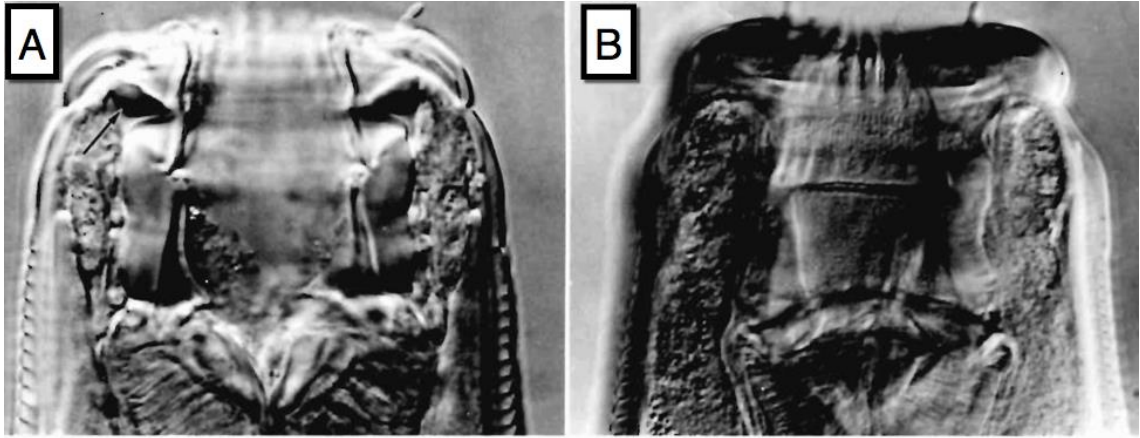


Şekil 2.3 *Strongylus* spp. baş kısımları, yandan görünüş. A. *S. edentatus*, ağız kapsülünde diş bulunmaz, dorsal oluk okla gösterilmiş, yüksek ağız yakası ve küçük sefalik papil; B. *S. equinus*, ağız kapsülünde dorsal ve ventralde 4 adet diş ile dorsal oluk; S. *vulgaris*, dorsalde iki adet lobları yüksek, yuvarlak ve düz olan diş, dorsal oluk; D. *S. asini*, dorsalde iki adet lobları alçak, düz ve oluklu diş, dorsal oluk. (19).

2.2.2 Cyathostominae

Cyathostominlerin ağız kapsülleri küçük, silindirik veya halka şeklindedir (Şekil 2.4). *Cylicocycclus* cinsindeki bazı türlerin uzunluğu 25 mm ye ulaşmasına rağmen, bu alt familyadaki erişkin nematodlar genellikle büyük strongylelerden daha küçüktür. Dünya

çapında cyathostominlerin prevalansı üzerine yapılan çoğu çalışmalar, Lichtenfels'in (19) morfolojik anahtarına dayanmaktadır. İlgili anahtarda Caballonema (Abuladze, 1937), *Cyathostomum* (Molin, 1861), *Cylicocyclus* (Ihle, 1922), *Cylicodontophorus* (Ihle, 1922), *Cylicostephanus* (Ihle, 1922), *Cylindropharynx* (Leiper, 1911), *Gyalocephalus* (Looss, 1900) ve *Poteriostomum* (Quiel, 1919) olmak üzere sekiz cins içerisinde 41 tür tanımlamıştır. Güncel çalışmalarla günümüzde bu alt aileye bağlı soylarda National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy veri tabanında moleküler identifikasyonları sağlanmış 35'in üzerinde türün varlığı görülmektedir.



Şekil 2.4 *Cyathostomum coronatum* baş kısımları, X 450. A. Medial, dorsoventral görünüm. B. Dorsal görünüm. (19).

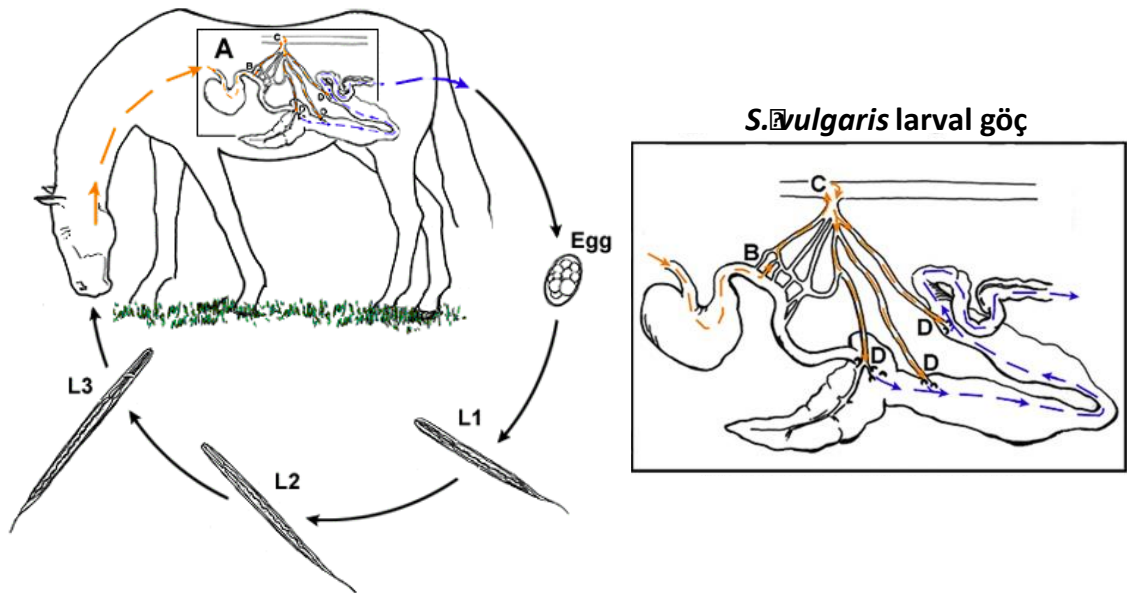
2.3 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE NEMATODLARIN BİYOLOJİSİ

2.3.1 *Strongylus* spp.

Tek tırnaklılarda parazitlenen *Strongylus* türleri direkt gelişmektedir, ancak larval aşamaları somatik göçleri içerdiği için biraz karmaşıktır. Bu soyun üyeleri için prepatent dönem 6 aydan (*S. vulgaris*) 10-12 aya (*S. edentatus*) kadar değişiklik göstermektedir (1).

S. vulgaris larvalarının arterlerde aneurizmalara neden olduğu bilinmektedir. 1949'da İsveç'te nekropsisi yapılan atların %90'ında bu tip aneurizmaların olduğu bildirilmiştir (23). Larvaların mezenterik arterlere nasıl göç ettiği konusunda farklı teoriler önerilmiş olmasına rağmen, 1960 ve 1970'lerdeki taylarda yürütülen deneysel enfeksiyonlar gerçekleştirilene kadar yaşam döngüsündeki detaylar açıklanamamıştır. *S. vulgaris*'in yaşam döngüsü Duncan ve Priie (7) tarafından ortaya konulmuştur (Şekil 2.5). Merada

bulunan ve üzerlerinde ikinci dönem larvalardan kalma kılıf bulunan üçüncü dönem larvalar (L3) atlar tarafından ağız yolu ile beslenme esnasında alınır. Kılıfını terk eden larvalar birkaç gün içerisinde ince ve kalın bağırsağın mukozasına nüfuz eder. Sonraki haftayı takiben larvalar gömlek değiştirerek dördüncü dönem larvaya geçer (L4) ve bağırsağın küçük arteriollerinin lümenine girerler. L4'ler kan akışının tersi yönünde arteriyele doğru göç ederler ve 14-21. güne kadar kranial mezenterik artere ulaştıktan sonra burada beşinci dönem larva (L5) halini almadan önce 3-4 aylık bir süre içerisinde önemli ölçüde gelişim gösterirler. Genç erişkinler olarak ifade edilen kılıflı L5'ler, kan akışı ile mezenterik arterlerden aşağı doğru sekum ve kolon duvarına geri dönerler ve burada subseroza içinde kapsüller halinde 5-8 mm çaplı nodüller oluştururlar. Daha sonra nodüller bağırsak lümenine doğru yırtılarak lümeninde genç erişkinler oluşur. 6-8 hafta sonra genç erişkinler eşeysel olgunluğa erişirler. Bazen sapık larva göçü nedeniyle arteriyel sistemin başka yerlerinde lezyonlar da oluşabilmektedir (7).



Şekil 2.5 *S. vulgaris*'in biyolojik döngüsü. Gastro-intestinal sistem (A), Enfeksiyondan 7 gün sonra *S. vulgaris*'in kılıflı L3'leri ince bağırsakta gömlek değiştirerek L4'ler oluşur ve bu L4'ler bağırsak mukozasına nüfuz ederler (B). L4'ler submukozal arterlere nüfuz eder ve endotel boyunca sekum ve kolik arterlere (enfeksiyondan 14 gün sonra) geçerler (C) ve enfeksiyondan 21. gün sonra kranial mezenterik artere ve onun kollarına göç ederler. Burada 3-4 aylık gelişme döneminden sonra, larvalar gömlek değiştirip genç erişkinler (L5) oluşur. L5'ler arterlerin lümeni ile bağırsak duvarına geri dönerler. Nodüller çoğunlukla sekum ve kolon duvarında L5'lerin etrafında oluşur (D). Bu nodüllerin yırtılmasıyla genç erişkin parazitler 6 ila 8 hafta içinde olgunlaşarak bağırsak lümenine salınır (http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/Strongls/strong_8a1.htm).

S. equinus larvaları sekum ve kolon duvarlarında bulunur ve burada gömlek değiştirerek L4'ler meydana gelir. Larvalar daha sonra subseroza göç eder ve yaklaşık 11 gün boyunca 10-15 mm uzunluğa eriştikten sonra nodüller halinde gelişim gösterir. Vücut boşluğu yoluyla karaciğere göç edip genç erişkin (L5) safhaya geçmeden önce burada geçici bir ağız kapsülü geliştirirler. 2-4 ay sonra erişkinler pankreas yoluyla sekum ve kolona göç ederler (19).

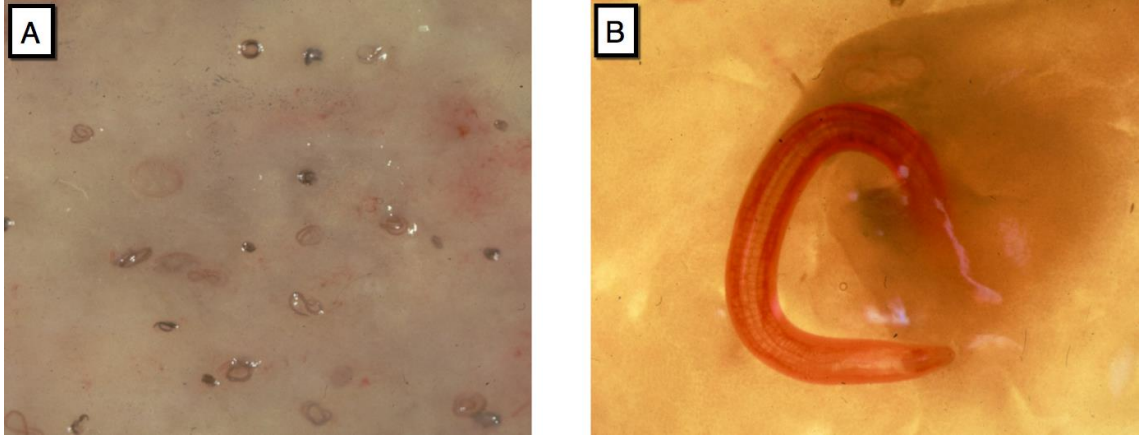
S. edentatus larvaları, portal ven yoluyla karaciğere ulaşır ve burada gömlek değiştirerek L4'ler oluşur. 9 hafta sonra karaciğerde gelişen ve büyüyen larvalar peritoneal membranlar altında göğsün sağ kısmından göç eder. Burada L4 ve L5'ler hemorajik nodüller oluşturur. Yaklaşık 90 gün içinde *S. edentatus* L5'ler sekum ve kolon duvarına göç eder ve gömlek değiştirdikten sonra erişkin nematodlar bağırsağın lümenine açılan nodüller oluşturur. Larvalar bazen sapık göç ederek testisler, göğüs boşluğu ve böbrekler gibi sıradışı yerlerde bulunabilir (19).

Strongylus dışındaki büyük strongillerin yaşam döngüsü ve larval gelişimiyle ilgili bilgi çok azdır. *Triodontophorus*'un enfektif larvaları mukozada küçük nodüllerin oluşumuna neden olan bağırsak duvarına girer, gömlek değiştirerek L4 haline gelir ve lümenine geri dönmeye önce genellikle L5 oluşur. Bağırsaktan göç olduğuna dair hiçbir kanıt yoktur. Genellikle *Triodontophorus* L4'leri mukozadaki nodüllerden ziyade bağırsağın lümenlerinde bulunurlar. *Triodontophorus* L4'leri, ağız kapsülünde bulunan lanset şekilli üç dişin varlığı ile anlaşılabılır (19).

2.3.2 Cyathostominae

Cyathostomin türlerinin yaşam döngüleri halen ayrıntılı olarak bilinmemektedir. Alınan L3'ler, sekum ve kolondaki Lieberkühn bezlerine girmeden önce ince bağırsakta gömlek değiştirir. Bu bezlerin altında larvalar mukozal tabakaya nüfuz ederler ve burada nodül oluşumuna yol açan fibroblastlar tarafından kapatılırlar. Bazı türler, örneğin büyük bir tür olan *C. insigne* submukozanın içine daha fazla girmeyi tercih ederken, *C. longibursatus* gibi daha küçük türler mukozada kalırlar (24). Kalın bağırsağın duvarında, L3'ler gömlek değiştirir ve L4'ler meydana gelir. L4'ler belirli bir süre sonra nodülleri terk eder ve bağırsak lümenine girererek gömlek değiştirip L5 haline dönerler (Şekil 2.6). Erişkin parazitler, türe bağlı olarak kalın bağırsakta farklı alanları tercih edebilirler (24). İlginç olarak erişkin parazitlerin genellikle larva gelişimin olduğu alanlardan daha uzak

anatomik bir konumda lokalize oldukları görülmektedir. Bu yönüyle Cyathostominlerin olgunlaşma sürecinde posterior olarak göç ettikleri belirtilmiştir (19).



Şekil 2.6 Bağırsak mukozası içinde ankiste Cyathostomin dördüncü dönem larva (A); Mukozadan bağırsak lümenine giren L4 (B) (25)

Erken dönem L3'lerin bir kısmı mukoza / submukozadaki gelişimlerini geçici olarak durdurabilir (26). Bu inhibisyon durumu yaşam döngüsünün normal bir parçası olarak kabul edilir (27) ve uzun süre devam edebilir. Gibson (28), inhibisyon halindeki larvaların üç yıl sonra at ahırlarında gelişimine hala devam edebileceğini göstermiştir. Larva inhibisyonu, evcil hayvanlardaki nematodlarda yaygın bir fenomendir. Bununla birlikte, hangi faktörün süreci başlattığı bilinmemektedir. Ruminantların nematodları için deneysel enfeksiyonlar, larvalar için konak bağışıklığı, populasyon büyüklüğü ve mevsimsel koşulların önemli olduğunu göstermiştir (29, 30). Bu faktörler ayrıca, Cyathostomin larvaları için potansiyel tetikleyici olarak da düşünülmektedir. Kuzey Yarım Küre'de hem atlarda hem de sığırlarda, inhibisyon halindeki larva yoğunluğunun kış mevsiminde ve mera koşullarındaki enfektif larvalar için kötü şartların bulunduğu durumlarda daha fazla olduğu gösterilmiştir (29, 31, 32).

Cyathostominler için prepatent dönemi genelde 2-3 aydır, ancak larval inhibisyona bağlı olarak bu süre değişiklik gösterebilmektedir. Prepatent dönemin yaşa bağlı olarak da değişiklik gösterebildiği, yaşlı atlarda helmintlerden ari taylara göre daha uzun olduğu ve belirtilmiştir (33). İskoçya'da doğal enfekte atlarda yapılan bir çalışmada (34) ortalama prepatent dönemin 54-62 gün arasında değiştiği gözlemlenmiştir.

2.4 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE NEMATODLARIN EPİDEMİYOLOJİSİ

Strongyle yumurtaları dışkı ile bulaşır ve uygun koşullar altında 2-4 gün içinde ilk L1 meydana gelir. Embriyonlaşmış yumurtalar düşük sıcaklıklara (hatta dondurucu) tolerans gösterdiği için bu durum daha fazla gelişmeyi geciktirmektedir (35). Yumurtadan çıkan larva oranı, doğrudan çevre sıcaklığı ile orantılıdır (36). Laboratuvar çalışmaları, 25-33 °C arasındaki sıcaklıklarda larvaların yumurtadan çıkma süresinin 24 saat içinde tamamlandığını ve buna karşın 5 °C'nin altındaki sıcaklıklarda gelişimin olmadığı göstermiştir (37). İlk evre larvalar donmaya ve kuraklığa da duyarlıdır. Kurak ortamdaki dışkı materyalinde bulunan yumurtalar açılır ancak L1'ler henüz gelişim göstermezler (36). L1'ler ikinci evreye gelmeden önce bakteri yiyerek beslenir. L2'ler kurumaya karşı oldukça dirençlidir fakat L1'ler gibi uzun süre soğuğa karşı direnç gösteremezler ve ölürlür.

Pre-enfektif larvalar ve enfektif L3 gelişimi ile dışkıda L3'lerin daha uzun süre hayatta kalması için, sıcaklık ve nem önem arz etmektedir. Bununla birlikte, çok kurak ortam olmadığı sürece sıcaklık, L3'lerin gelişimi için sınırlayıcı bir faktördür. Laboratuvar koşullarında, L3'ler ancak 10-35 °C arasında inkübe edilen dışkıdan izole edilebilir. L3 gelişimi, en düşük sıcaklıkta 15-24 gün, en yüksek sıcaklıkta ise 3 gün sürmektedir (37).

Birçok gastro-intestinal nematodda olduğu gibi, enfektif L3'leri, L2'den kalma kılıf korur ve bu da bitki üzerinde uzun süre hayatta kalmak için yararlıdır. Dolayısıyla, L3'ler beslenmez, ancak depolanan besin maddeleriyle beslenirler. L3'ler kurak ortamda, nemli koşullara kıyasla daha uzun süre hayatta kalırlar, çünkü bir önceki larvalar aktif değildir ve bu nedenle enerji tasarrufu sağlar, buna karşın takip eden süreçte daha yüksek sıcaklık dışkı içinden otlara doğru göçü sitümile eder. Bu durum da depolanan enerjinin tükenmesine neden olur (37).

L3'lerin hepsinin aynı anda dışkıdan göç etmediği gösterilmiştir; dışkı depositleri, larvaların aralıklı olarak serbest bırakılması açısından önemli bir rezervuar olarak görülmektedir (36). İskoçya'da yapılan bir arazi çalışmasında (38) ılıman koşullar altında, 4 hafta sonra dışkıda çok az enfektif larvanın kaldığı gösterilmiştir.

L3'lerin, soğuktan korunabildikleri iyi bilinmektedir. Bu açıdan mera üzerindeki L3'ler kış boyunca hayatta kalabilir. Ancak, kışı atlatan larvalar genellikle bir sonraki yaz dönemi için büyük bir tehdit oluşturmaz. İskoçya, Kanada ve İsveç'te yapılan araştırmalarda (39, 40), Mayıs ve Haziran aylarının sonlarına doğru, mera üzerinde kışın enfektif larvaların sayısının, besin kaynağının tükenmesi ve taze çimle seyreltilmesinden ötürü çok düşük seviyelere indiği kaydedilmiştir. Burada esas önemli nokta, yumurtadan çıkan L3'lerin mevcut otlatma mevsiminde geçmesidir.

Dışkıdaki yumurtaların ilkbaharda arttığı görülür (41, 42). Bu yumurtalar, bir önceki yılda alınan ve daha sonra kış boyunca inhibe edilen larvalardan gelişen erişkin parazitlerden kaynaklanır. Yumurta çıkarımı, mera üzerinde serbest yaşama evrelerinin gelişimi için koşullar optimum hale geldiğinde, genellikle Temmuz-Eylül ayları arasında zirveye ulaşır (43). Kuzey Amerika'da, kalın bağırsakta bulunan erişkin *Cyathostomin*lerin en yoğun sayıları Mart ve Eylül aylarında görülmüştür (44). Yaz sonlarında ve sonbaharın başlangıç dönemlerinde yağışlarla birlikte tipik olarak otlardaki L3 sayısında büyük artışlar görülür (39, 40, 43). Coğrafik bölgeye bağlı olarak, iklim farklılıkları farklı bulaşma dinamiklerine neden olur. Yağış, sıcaklık, nem ve dışkıda bozulma gibi birçok faktör, yumurta ve larva gelişimini ve larvaların hayatta kalmalarını direkt etkilediği için preparaziter gelişim dinamiklerinin tahmin edilmesi zordur (25).

2.5 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE NEMATODLARIN PREVALANSI

Atları enfekte eden üç *Strongylus* türü dünya genelinde yaygın olup bunları arasında özellikle *S. vulgaris* en patojenik tür olarak kabul edilir. Ancak son yıllarda modern antihelmintiklerin yaygın olarak kullanımı sayesinde, *S. vulgaris* olguları büyük ölçüde azalmıştır (45). İlgili parazitin parazit kontrolü için antihelmintiklerin kullanılmadığı sürülerde prevalansı yüksek kalmıştır (46).

Neredeyse otlayan tüm atlar *cyathostomin*ler ile enfektendirler. Toplam parazit yükünün büyük bir kısmı bağırsak mukozası ve submukozadaki larval dönemlerden oluşmaktadır. Bağırsak lümenindeki *cyathostomin*lerin sayısı birkaç bin ile 1.200.000 arasında değişebilmektedir (47). Genel olarak, erişkin parazitlerin %90'ı dorsal ve ventral kolon boyunca dağılım gösterirken, geri kalan %10'u ise sekumda bulunmaktadır (31, 44, 46).

Atları kırktan fazla cyathostomin türü enfekte edebilmesine rağmen, dünya çapındaki prevalans çalışmaları, at sürülerindeki cyathostomin popülasyonlarının büyük çoğunluğunun 10'dan daha az türden oluştuğunu göstermiştir (18, 46, 48). Genel olarak bir atın yaygın türlerden 5 ila 10 tanesi ile enfekte olduğu bildirilmiştir (18). *Cylicostephanus longibursatus*, *Cylicocyclus nassatus* ve *Cyathostomum catinatum*'un en yaygın üç tür olduğu bildirilmiştir (48-50). Ancak, bu çalışmalar *Cylicocyclus nassatus* ve *Cylicocyclus ashworthi*'nin yeniden tanımlanmasından önce gerçekleştirilmiş olup (51), iki tür arasındaki morfolojik benzerlikler nedeniyle, muhtemelen *Cylicocyclus ashworthi* prevalansı *Cylicocyclus nassatus* lehine düşük tahmin edilmiştir. Yakın zamanda İskoçya'da yapılan bir çalışmada *Cylicocyclus ashworthi*'nin en bol tür olduğu rapor edilmiştir (52).

Türkiye'de yapılan araştırmalarda tektırnaklıların paraziter enfeksiyon oranlarının %16,2 ile %100 arasında değiştiği rapor edilmiştir (53-57). Tüm bu araştırmalar (54-66) Türkiye'de de tek tırnaklılarda en çok yayılış gösteren helmintlerin Strongylidae ailesine ait olduklarını göstermiştir. Türkiye'nin farklı bölgelerinde yapılan ilgili araştırmalar (54-66) atlarda Strongylidae spp. enfeksiyon oranlarının %63,04-%100,0 arasında olduğunu rapor etmiştir. Yukarıda yapılan çalışmalar sonucunda Türkiye'de atlarda *S. vulgaris*'in larva kültürü ve nekropsi sonuçlarına göre %2,9-35,3 arasında değiştiği görülmektedir.

2.6 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE NEMATODLARIN KLİNİK VE PATOGENEZİ

2.6.1 *Strongylus vulgaris*

Ergin *S. vulgaris*'in patojenik etkileri, kalın bağırsak mukozası tıkanıklığı ile ilişkilidir. Ergin parazitlerin beslenme alışkanlıkları, mukozal tabakaya zarar vermekte ve ara sıra kan damarlarının yırtılmasına sebep olmaktadır. Bağırsaktaki erişkin parazitlerin etkileri larvaların sebep olduğu etkilere göre daha az önem taşıyor olmasına rağmen, atlarda ağır enfeksiyonların bitkinliğe ve anemiye neden olabileceği kaydedilmiştir (67).

S. vulgaris enfeksiyonunun patojenik etkileri öncelikle göç eden larval dönemlerden kaynaklanmaktadır. Larvalar özellikle cranial mezenterik arter ve dallarında endoarterite sebep olmaktadır. Bu durum, arter duvarının kalınlaşmasını, tromboz oluşumunu ve bağırsakta olası infarktüsleri ve nekrozu provoke etmektedir. "Parazit kaynaklı aneurizma" terimi, göç eden larvaların bir sonucu olarak ortaya çıkabilen arteriyel duvarın

dilatasyonu ve incilmesi ile oluşan gerçek aneurizmaları ifade etmektedir. *S. vulgaris* larvalarının neden olduğu lezyonların klinik önemi, büyüklükleri ve yerlerine bağlıdır. Karın distressi ve kolik, en yaygın klinik belirti olarak görülmektedir. Taylarda, deneysel enfeksiyonu izleyen birkaç hafta içinde, vücut sıcaklığında artış, anoreksi, depresyon ve karın ağrısı gibi klinik semptomlar gözlenmiştir (7).

Deneysel olarak larval göçün, eozinofilik pnömoni, epikard ve karaciğerdeki eozinofilik granülomalar gibi ekstra vasküler lezyonlara neden olabileceği de bulunmuştur (68). Doğal koşullar altında, uzun süre boyunca az sayıda larvaya maruz kalan taylar oluşan enfeksiyonu büyük ölçüde tolere edebilmekte ve şiddetli semptomlar nadiren görülmektedir. Aşırı kontamine otlaklarda tayların doğal enfeksiyonu üzerine yapılan bir araştırmada (69), larvalara bir ay maruz kalmanın halsizlik ve kilo kaybına yol açtığı gösterilmiştir. Yaşlı atlar da *S. vulgaris* enfeksiyonuna duyarlı olmasına rağmen, genç atlarda enfarktüs ve kolik komplikasyonları daha yaygındır. Genellikle, *S. vulgaris* kaynaklı kolik, yılın diğer zamanlarına göre kış boyunca daha sık görülmektedir. Büyük olasılıkla, bu durum kış ayları boyunca arteriyel sistemdeki larva sayısının en yüksek düzeyde olmasından kaynaklanmaktadır (47).

2.6.2 Cyathostominae

Yaklaşık 150 yıl önce atların kalın bağırsak mukozasındaki parazitlerin ishal ile ilişkili olduğu gözlemlenmesine rağmen, cyathostominler esasen non-patojen olarak kabul edilmiş ve 50 yıl önce, cyathostominosis'in klinik bulgularının ayrıntılı tanımlamaları yapılmıştır (2). *S. vulgaris* enfeksiyonuna yakalanan atlarda görülen dramatik belirtiler nedeniyle, cyathostominlerin patojenik etkileri muhtemelen veteriner hekimler tarafından gözden kaçırılmıştır. Ancak, *S. vulgaris*'in azalması ve anthelmintiklere dirençli olan cyathostominlerin takip eden süreçteki artışı, bu parazitlerin göreceli olarak önemini değiştirmiştir. Günümüzde, cyathostominler atların temel patojen nematodları olarak kabul edilmektedir (2). Erişkin nematod enfeksiyonları hafif ishal ile ilişkili olabilmesine rağmen, klinik önemlerinin az olduğu kabul edilmektedir. *S. vulgaris*'de olduğu gibi sebep olunan hasarın büyük bir kısmından larval dönemler sorumludur. Mukoza ve submukozadaki larvalar fibröz bir kapsül ile çevrilidir ve genellikle submukozada daha yoğun olmak üzere eozinofilik bir yangı tablosu oluştururlar (49). Kapsülle çevrilmiş olan larvaların etrafında sıklıkla goblet hipertrofisi ve hiperplazisi görülmektedir. Larvaların bağırsak duvarından lümen içine geçişi, muskular mukozanın yırtılmasına, yoğun

eozinofili ve ödemin ortaya çıkmasına ve bunu takiben nötrofil ve makrofaj infiltrasyonuna neden olmaktadır. Şiddetli enfeksiyona yakalanmış atlar, bağırsak mukozasının santimetrekaresinde 60'a kadar larva taşıyabilmektedir (49).

Larval cyathostominosis olarak adlandırılan bir klinik sendrom (18), inhibe edilen larvaların senkronize edilmiş reaktivasyonundan ve ardından L4'lerin bağırsak lümenine kitlesel olarak geçişinden sonra meydana gelmektedir. Klinik tablonun gelişimi ile ilişkili risk faktörleri arasında atların yaşı, mevsim ve son anthelmintik tedavisi bulunmaktadır (70). Larval cyathostominosis, her yaştan atlarda bulunmasına rağmen öncelikli olarak altı yaş altı atları etkileyen akut bir hastalıktır. Durum mevsimsel olup ılıman iklimlerde, genellikle mukozal larvaların inhibisyon sonrasında gelişimine devam ettiği Ocak-Mayıs aylarında görülmektedir (71). Böylece, bir dereceye kadar, sığırlardaki tip II ostertagiosis ile karşılaştırılabilir (72). Larval cyathostominosis bazen bireysel bazen de salgın olarak görülebilmektedir (73). Cyathostominosis olgularında temel klinik belirtinin kilo kaybı olduğu kaydedilmektedir (2). Diğer tipik klinik belirtiler; kronikleşebilen, şiddetli ve ani başlayan ishal, kondisyon kayıpları, iştahın normal olmasına rağmen zayıflık, ekstremiteler ve ventral karnın subkutan ödemi olarak sayılabilmektedir (74). Ölüm oldukça yaygın olup %50'den fazla mortalite oranı bildirilmiştir (75). İngiltere'de, larval cyathostominosis'in bir yaştan üstündeki atlarda kronik ishalin en yaygın sebebi olduğu bildirilmiştir (76). Tanı, atın geçmişi ve dışkıda cyathostomin larvalarının varlığına dayanmaktadır. Buna ek olarak, dışkıdaki negatif veya düşük yumurta sayısı, nötrofil, hipoalbuminemi ve b-globulinlerde artış ile birlikte hiperglobulinemi gibi daha az spesifik bulgular tanıyı desteklemektedir. Klasik mevsimsel sendroma ilaveten, cyathostomin enfeksiyonuyla ilişkili olarak farklı klinik belirtiler de bulunmaktadır. Bunlar, yaşlı midillilerde spesifik olmayan kolik, tekrarlayan ishal ve kalın bağırsakta multifokal boğulma olmayan enfarktüsü içermektedir (75). Atlar ayrıca, muhtemelen cyathostominler tarafından indüklenen proteinin kayıpları sonucu şekillenen enteropatiye bağlı olarak, kondisyon kaybı, kilo kaybı ve bozulmuş bağırsak motilitesi gibi hafif veya subklinik belirtileri gösterebilirler (1).

2.7 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE ENFEKSYONLARINA KARŞI İMMÜNİTE

Genç atların daha yaşlı hayvanlara kıyasla güçlü bir enfeksiyona daha yatkın oldukları uzun süredir kabul edilmektedir. Ancak bağışıklık yanıtlarında yer alan mekanizmalar

karmaşık olup bu konuda fazla çalışma bulunmamaktadır. Birtakım gözlemler, bağışıklığın artan yaşla edinildiğini göstermektedir. Dışkıda çok sayıda yumurta bulunması ve klinik cyathostominosis, genç atlarda, yani altı yaşın altındakilerde daha sık görülmektedir. Cyathostominlerin prepatent sürelerinde ve tedavi ile erginlerin elimine edilmesinden sonra dışkıda yumurtaların tekrar görülmesi için gerekli zaman diliminde yaşa göre farklılıklar bulunmaktadır. Bu faktörler genç hayvanlarda yaşlı hayvanlara kıyasla daha kısadır (34, 42). Ayrıca, doğal enfekte atların cyathostomin yükleri üzerine yapılan araştırmalarda, 8 yaşın üzerindeki atlara kıyasla taylarda tür çeşitliliğinin arttığı gözlemlenmiştir (77). Strongil enfeksiyonlarına karşı kazanılmış bağışıklığın kanıtları deneysel enfeksiyonlarla elde edilmiştir. *S. vulgaris* üzerine yapılan araştırmalar, daha önce enfeksiyona maruz kalmış olan atların bu nematodlardan arınmış hayvanlara kıyasla yeniden enfeksiyona karşı belirgin bir direnç kazandığını ve daha az klinik bulgu ortaya çıkardığını göstermiştir (7). Taylar üzerinde yapılan bir araştırmada (78), yoğun bir şekilde kontamine meralarda beslenen hayvanlarda L3'lere karşı immunitenin indüklendiği gözlemlenmiştir. Bu tayların ikinci kez aynı merada larvalara maruz kalması mevcut nematodların atılmasıyla sonuçlanmıştır (78). Bu atılım, koyunların nematod enfeksiyonlarında sıklıkla görülen ve Th2-aracılı immun reaksiyon olarak bilinen self cure mekanizmasına benzer bir olaydır.

Konağın immun yanıtı, nematodların yaşam döngülerindeki farklı dönemleri tarafından yönlendirilmektedir. Daha önce enfeksiyona maruz kalmış midillilerin mukozasında, maruz kalmayanları ile karşılaştırıldığında, daha yüksek sayıdaki erken L3'ler ve diğer ankiste larva dönemleri gözlemlenmiştir (79). Önceden enfeksiyona maruz kalmış midillilerde bazı konak faktörlerinin larval inhibisyonu tetiklediği ileri sürülmüştür. Önceden enfekte edilmiş ve helmint naif tayların cyathostomin yüklerinin kıyaslandığı bir başka çalışmada, daha önce enfeksiyona maruz kalmış hayvanlarda mukozal dönemlerin daha yüksek oranlarda olduğu, fakat toplam helmint yükünün ise daha düşük olduğu ortaya koyulmuştur (34). Buna karşın, erişkin hayvanlara nazaran (ortalama 8,6 yaşındaki hayvanlar), meraya çıkmış taylarda daha yüksek sayıda inhibe larva bulunduğu bildirilmiştir (34).

Genel olarak gastrointestinal nematodlar, interlekin-4 (IL-4), IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 ve IL-13 gibi sitokinlerin salgılanmasını içeren Th2 tipi hücresel yanıtla bağlantılıdır. Th2 immun yanıtı, eozinofillerin, bağırsak mast hücresi birikiminin ve neticede IgE üretiminin

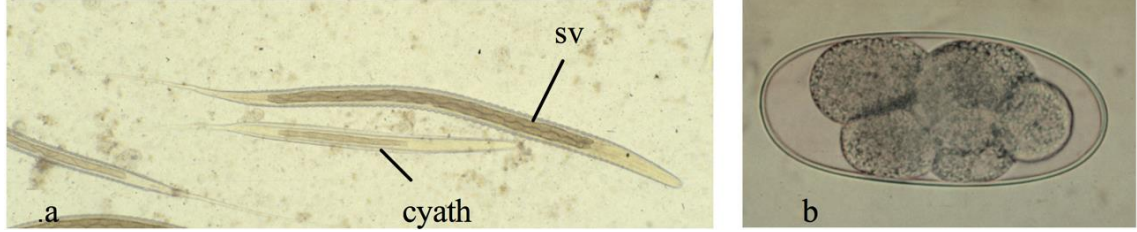
harekete geçirilmesinden sorumludur. Bu nedenle, parazite maruz kalmış hayvanlarda eozinofiller ve IgE seviyeleri önemli ölçüde artabilmektedir. Bu efektörler, bazen helmint enfeksiyonlarında görülen ürtiker gibi tip I aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olabilmektedir (80).

Helmint enfeksiyonlarının en yaygın immünolojik özelliği eozinofillerin artışıdır. Bağırsak duvarındaki cyathostomin larvalarının çevresinde sıklıkla çok sayıda eozinofil gözlemlenebilmektedir. Periferik eozinofili, stronglylosisli atlarda çok değişken bir bulgudur. Daha önce enfeksiyona maruz kalmış yetişkin midillilerin cyathostomin L3'leriyle deneysel enfeksiyonunu takiben, eozinofil sayısının 10 gün içinde hızla yükseldiği ve iki yılı aşkın bir süre boyunca yüksek seviyede kaldığı bildirilmiştir (33). Uzamış eozinofilinin, inhibe larvaların varlığı ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Bir çalışmada (81), enfeksiyonla mücadele öncesi radyasyonla zayıflatılmış *S. vulgaris* L3'leri ile immunize edilmiş midillilerin, parazitlerin çözünebilir somatik ekstraktları ile immunize edilmiş midillilerle kontrol grubundakilere kıyasla belirgin eozinofili gösterdikleri bildirilmiştir. Ayrıca bir ay boyunca karma strongil enfeksiyonlarına maruz kalan taylarda yapılan bir araştırmada (69), iki hafta otlattıktan sonra kanda eozinofil sayısında belirgin bir artış olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, klinik olarak etkilenen atlarda eozinofili tablosu tutarlı bir bulgu değildir ve eozinofili bulunmaması strongil enfeksiyonu tanısını saf dışı bırakamaz (75). Larval cyathostominosis'in 15 klinik olgusunu içeren bir raporda, lökositozun sıklıkla mevcut olduğu ancak bu durumun eozinofiller yerine nötrofillerdeki artışla alakalı olduğu bildirilmiştir (71).

2.8 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE ENFEKSYONLARININ TEŞHİSİ

Ergin strongillerin tespit edilmesinde en sık kullanılan teşhis yöntemi gram dışındaki (EPG) strongil yumurtalarının (Şekil 2.7b) sayısının belirlenmesiyle yapılmaktadır. Dışkıda yumurta sayımının dezavantajı, seksüel olarak olgunlaşmamış larva yükünü tam olarak yansıtmamasıdır: lümendeki L4 ve L5, mukozada gelişen L3 ve L4 ile mukozadaki inhibe L3'ler. Bu nedenle, larval cyathostominosisden şüphelenilmesi durumunda dışkıda yumurta sayımı geçerliliğini kaybedebilmektedir. Ayrıca yumurta üretimi üzerine nematod yoğunluğunun etkileri, yumurtaların dağılımı ve dışkı kıvamı gibi faktörlerin bilinmesi de zorunluluk arz etmektedir. Buna karşın dışkıda yumurta sayımı; antelmantik etken maddelerin etkinliklerin kıyaslanması, ilaç dirençliliğinin belirlenmesi ve

antelmantik tedaviler arasındaki doğru etkileşimin saptanması gibi durumlarda oldukça kullanışlı bir metottur (82, 83).



Şekil 2.7 *S. vulgaris* (sv) ve Cyathostominlerin (cyath) L3'ü (a); strongil yumurtası (b). (25)

Morfolojik olarak strongil yumurtalarına bakılarak tür teşhisi yapılamadığı için dışkı örnekleri 20-25°C'de yaklaşık 10-14 gün süresince L3 gelişimi için kültüre edilir ve kültür sonrası bu L3'ler Baermann yöntemiyle toplanabilmektedir (84). L3'lerin bağırsak hücrelerinin sayısı ve şekli temel alınarak morfolojik açıdan cyathostominlerden birini diğerinden ayırt etmek mümkün olabilmektedir, ancak halen daha birçok cyathostomin türü bu yöntemle ayırt edilememektedir (Şekil 7a). Son yıllarda, klinik olarak enfekte atların dışkılarındaki olgunlaşmamış cyathostomin larvalarının belirlenmesinde Baermann tekniği başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (85).

Son yıllarda, strongil nematodların olgunlaşmamış larval dönemlerinden tür teşhisini mümkün kılan moleküler methodlar geliştirilmiştir (86, 87). Özellikle bu nematodların ribosomal DNA sekansları karakterize edilerek bazı türler belirlenebilmektedir. Birinci ve ikinci internal transcribed spacers (ITS-1 ve 2) (88) ile intergenic spacer (IGS) (89) gen bölgeleri türlerin ayırımında genetik markerlar olarak kullanılmıştır. ITS sekanslarından, en sık görülen bazı türler (*S. vulgaris*, *C. catinatum*, *C. nassatus*, *C. longibursatus* ve *C. goldi*) için tür spesifik PCR primerleri dizayn edilerek yumurta ve larvalarda parazit DNA'sına bakılarak tür teşhisinin yapılabilmesi mümkün kılınmıştır (90). Yapılan bir çalışmada (91), ishalli atlardan toplanan L4'lerden PCR-ELISA yöntemiyle özellikle altı türün (*C. ashworthi*, *C. nassatus*, *C. insigne*, *C. longibursatus*, *C. goldi* ve *C. catinatum*) teşhisinin yapılabilmesi amacıyla IGS oligoprobları geliştirilmiştir. En az iki türle enfekte hasta atlardan alınan örneklerde miks enfeksiyonların ayırımında bu yöntemin başarılı olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca,

birbirine çok yakın cyathostominlerin tür düzeyinde ayırımında mikroçip tabanlı kapillar elektroforez teknolojisi geliştirilmiş ve bazı türler için başarılı sonuçlar alınmıştır (92).

Larval cyathostominosis'in teşhisinde mukozalardaki larvaları saptayabilen bir metot oldukça faydalı olacaktır. Son yıllarda bu alanda, prepatent periyod içerisinde mukozalardaki larvalara karşı oluşan immun yanıtta serum IgG(T) düzeyinde artışa sebep olan larval somatik antijenler üzerinde çalışmalar da yapılmaktadır (93). Deneysel ve doğal enfekte at ve midillilerden elde edilen serumları kullanarak 2 putatif teşhis antijen kompleksi identifiye edilmiştir (94, 95). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, atlarda ishal ve kilo kaybı gibi klinik durumlarda kullanılmak üzere bir immunoassay tekniğinin geliştirilebileceğine işaret etmektedir. Ayrıca *S. vulgaris* enfeksiyonlarının teşhisinde cranial mezenterik arterdeki değişimleri saptamak amacıyla arteriografi, ultrasonografi gibi görüntüleme tekniklerinden de yararlanılmaktadır (93).

2.9 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE ENFEKSYONLARININ TEDAVİ VE KONTROLÜ

At strongyle enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasının amacı, otlatma alanlarındaki yumurta sayısını ve enfektif L3'leri en aza indirmek ve böylece klinik ve subklinik hastalığı önlemektir. Bu amaca nasıl ulaşılabileceğine dair çeşitli yaklaşımlar vardır, ancak geleneksel olarak kontrol antihelmintik ilaçlarla düzenli tedaviye dayanmaktadır. Şüphesiz en güvenilir kontrol yöntemi atların otlatılmasını önlemektir, ancak hayvan refahı nedeni ile bu yöntem gelişmiş ülkelerde uygulanmamaktadır.

Başlangıçta, antihelmintik kontrol programları öncelikle strongyle türlerine, özellikle de patojen *S. vulgaris*'e yöneliktir. *S. vulgaris* ve bu parazit ile ilgili kolik prevalansı gerçekten de azalmış, ancak ne yazık ki antihelmintiklerin yaygın ve yoğun kullanılması, ilaca dirençli *Cyathostomin* popülasyonlarının seleksiyonuna yol açmıştır. Mevcut durumda strongyle nematodlara karşı kullanılan üç ana sınıf antihelmintik ilaç vardır:

- 1) benzimidazoller (örneğin tiyabendazol, oksibendazol ve fenbendazol)
- 2) tetrahidropirimidinler (pirantel)
- 3) makrosiklik laktonlar (ivermektin ve moksidektin).

Bu ilaçların tümünün piyasaya ilk sürüldüğünde, strongyle nematodlarının ergin safhalarına karşı yüksek etki (>%90) gösterdiği görülmüştür. Bununla birlikte, ilgili ilaçların larval dönemlere etkinlikleri değişmektedir. Makrosiklik laktonlar *S. vulgaris*'in larvalarına (96) karşı oldukça etkili olmasına karşın, benzimidazoller ve pirantelin o kadar da etkili olmadığı rapor edilmiştir (97, 98). Cyathostomin pre-yetişkin dönemlerle ilgili olarak, ivermektinin luminal L4'lere karşı yüksek etkinliği gösterilmiştir. Ancak ilaçların dozu arttırılrsa bile (99, 100) erken L3'lere, geç L3'lere ve mukozal L4'lere karşı etkili olmadığı gösterilmiştir. Moksidektin yetişkinlere ve luminal L4'lere karşı ivermektin kadar etkilidir ve buna ek olarak mukozal L4'ler bu ilaçla başarıyla indirgenmektedir (101). İnhibe erken L3 antihelmintiklere karşı en az duyarlı oldukları safha olarak kabul edilir. Temiz otlaklara taşımak ve tedavi etmek sığır ve koyunlara kıyasla atlarda daha az başarılı bir stratejidir. Bununla birlikte beş gün süreyle fenbendazol ile tedavi edilen inhibe L3'lerin yanı sıra yetişkinlere karşı oldukça etkili olduğu deneysel olarak gösterilmiştir (102). Bununla birlikte yapılan bir saha araştırmasında (103), benzimidazol dirençli popülasyonlara karşı beş günlük bir fenbendazol kullanımının dışkı yumurta sayılarını kabul edilebilir seviyelere düşürmekte başarısız olduğu görülmüştür.

Antihelmintik tedavi için farklı seçenekler vardır;

- a) Bütün atlara 6-8 hafta da bir aralıklarla uygulanan interval doz
- b) Mera üzerinde gelişimin mevsimsel dinamikleri ve L3'ün hayatta kalması üzerine kritik noktalardaki tüm atların stratejik tedavileri;
- c) Atların bireysel olarak, dışkıda ki gram dışkı yumurta sayısının (EPG) belirlenmesi üzerine hedeflenmiş tedaviler.

ABD'de antihelmintik ilaçların günlük ve aylık uygulamaları da mevcuttur (104). Artan antihelmintik direnç problemlerine karşı, mevcut bileşiklerin etkinliğini korumak hayati önem taşımaktadır. At parazitologları ve veteriner hekimler arasında, farklı sürüler için ayrı ayrı şekillendirilmiş tedavi programlarının daha eski olan aralıklı dozlama sistemlerinin yerine geçtiği görülmektedir (27, 105). Bu uygulama, tedavilerin sayısını azaltmak ve böylece antihelmintik direnç için seleksiyon baskısını azaltmaktır. Bir sürü içindeki EPG dağılımı çoğunlukla eğik bir dağılım göstermektedir ki bunun nedeni bireylerin çoğunluğunun ya az sayı da ya da hiç yumurta atmamasıdır. Bu nedenle aralıklı

tedaviden ivermektin tedavisine geçişin toplam antihelmintik tedavi sayısını belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir (106, 107). Bazı atların parazit enfeksiyonuna karşı eğilimli oldukları ve "solucan" atlar olarak adlandırılan bu atların sürü için bir enfeksiyon rezervuarı olarak hizmet ettiği bildirilmiştir. Uzun süreli saha araştırmaları ile henüz teyit edilmemesine rağmen, aynı bireylerin eşleştirilmiş dışkı yumurta sayısı arasındaki anlamlı korelasyon bulgusu bu teoriyi desteklemektedir (108, 109). Antihelmintik tedaviden sonra yumurtanın tekrar görünme periyodu (ERP), dışkıdaki strongyle yumurtalarının tekrar tespit edilene kadar geçen zaman aralığı için kullanılan terimdir. Dolayısıyla ERP, tedavi aralıklarının oluşturulması için bir kaynak oluşturmaktadır. Genellikle, ERP 4-12 hafta arasında değişmektedir. Moxidectin'in, strongyle tip yumurta atımı üzerine en uzun baskılayıcı etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (110). Bununla birlikte, ERP'nin değişkenliğini sadece antihelmintik ilacın seçimi değil, aynı zamanda sürü boyutu, atların yaşı, mera ve yönetim faktörleri ve iklimsel / mevsimsel varyasyonlar gibi faktörler de etkilemektedir (35). Bu nedenle, uygun tedavi aralıklarının belirlenmesi zor olabilmektedir.

Antihelmintik tedavi, strongyle nematodların yaşam döngüsünü kırmak ve böylece mera üzerine bırakılan yumurta sayısını azaltmak için kullanılan bir tedavi yöntemidir. Kimyasal tedaviye entegre edilmesi gereken diğer yöntemler de vardır. Özellikle genç atlarda antihelmintik tedavilerin azalmış etkinliği ve daha kısa ERP lerin bildirildiği rapor edilmiştir (111). Parazitle mücadele etmede mera hijyeninin önemi vurgulanmaktadır ancak bununla birlikte pratik engeller de vardır. Meralardan haftada iki kez dışkıların uzaklaştırılmasının etkili bir kontrol sağladığı, hatta bu işlemin antihelmintiklerden daha etkili olduğu gösterilmiştir (41). Ek olarak, kontamine alanlar temizlendiğinde otlatma alanları büyük ölçüde artmaktadır. Haftada iki kez dışkıların uzaklaştırılması, L3'lerin gelişmesine ve göç etmesine izin vermemektedir. Meralık alanların biçilmesi/sürülmesi ve zincirle tırmıklama sıklıkla uygulanan prosedürlerdir. Bununla birlikte, larvaları kurutarak öldürmek yerine, yaşayan larvaların mera üzerine etkin bir şekilde yayılması da bir başka fikirdir. Mera üzerinde larvaların birikimini azaltacak diğer otlatma stratejileri aşağıdaki gibidir (41):

- daha az otlatma,
- koyun / sığır ile karışık veya alternatif otlatma,

- hasattan sonra otlatma
- yeniden tohumlama ve sınırlı, kontrollü mera yakımı.

Biyolojik kontrol olarak kullanılan, nematodların doğal avcıları olan mantarlar strongyle nematodların kontrolü için kimyasal olmayan bir yaklaşımdır. Sığır, koyun ve domuz çiftliklerinde kullanan mantar *Duddingtonia flagrans*'ın enfektif larvaların sayısını azaltmada başarılı olduğu gösterilmiştir (112). *D. flagrans*'ın sporlarının bir formu olan Chlamydospores, mera üzerinde enfektif larvaları, hiflerinin yapışkan üç boyutlu ağı ile sıkıştırıp yok etmektedir. Danimarka'da atlarla yapılan çalışmalarda, *D. flagrans*'ın, mera üzerindeki L3 sayısını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (113, 114). Ayrıca, subtropikal bir iklimde yapılan saha çalışmalarından elde edilen kanıtlar, tektırnaklı parazit kontrol programlarında potansiyel bir biyolojik kontrol maddesi olarak *D. flagrans* kullanımını desteklemektedir (115).

Atları bu parazitten korunmak için radyasyonla zayıflatılmış *S. vulgaris* L3'ler ile oral yoldan aşılama için girişimler de denenmiştir. Enfeksiyondan önce aşılama ve bağışıklığı olmayan taylar üzerine yapılan deneysel çalışmalarda umut verici sonuçlar elde edilmiştir (116). Uzun dönemli çalışmalarda aşılama tayların, akut verminöz arteritiden korunma sürelerinin yedi ay olduğu tespit edilmiştir (117). Bununla birlikte, aşılamanın antihelmintik kontrol programları ile birlikte uygulanmaları halinde daha etkili olacağına dair tespitler de ortaya konulmuştur. 1980'lerde yapılan bu çalışmaların (116, 117) sonuçları umut verici olsa da ticari *S. vulgaris* aşısı üretilememiştir. Bunun nedeni muhtemelen makrosiklik laktonların kullanıldığı bölgelerdeki parazitlerin azalmasıdır. Buna ek olarak, donör atlarda strongyle larvalarını çok sayıda üretmek için pratik ve etik sorunlar bulunmaktadır.

2.10 TEKTIRNAKLILARDA STRONGYLE ENFEKSYONLARINDA ANTİHELMİNTİK DİRENÇLİLİĞİ

Parazit enfeksiyonlarının kontrolünde ciddi tehdit oluşturan antihelmintik bileşiklerin yoğun ve yaygın kullanımı, parazitler arasında ilaç direncinin gelişmesine neden olmuştur. Bütün ilaç sınıflarına karşı gelişen bu antihelmintik direnç küçük ruminantlarda oldukça akut durumdadır. Bazı Güney Yarımküre ülkelerinde, birden fazla ilaca direnç, kimyasal maddeye bağlı koyun yetiştiriciliğini imkansız hale getiren seviyelere ulaşmıştır

(118). Atların strongyle nematodlarının, modern geniş spektrumlu anthelmintiklerine karşı direnç göstermesi 1965’de tiyabendazol’un piyasaya sunulmasından sadece dört yıl sonra gerçekleşmiştir (25). Anthelmintik direncin *Strongylus* türleri arasında arasıra meydana geldiği düşünülmesine rağmen, cyathostomin popülasyonlarındaki bu problem dünya çapında kabul görmüş durumdadır (119).

2.10.1 Tanımlar

Anthelmintik direnç, daha önce aynı ilaca duyarlı olan parazit popülasyonlarında genetik olarak transfer edilen bir duyarlılık kaybı olarak tanımlanmaktadır (120).

Yan direnç, direnç gelişen bir bileşiğin yerine benzer etki mekanizmasına sahip başka bir bileşiğin kullanılması sonucu oluşmaktadır.

Eski haline dönme, seçici maddenin uzaklaştırılmasının ardından bir popülasyonda dirençli bireylerin sıklığında meydana gelen azalmadır (121).

2.10.2 Direnç Mekanizması

Anthelmintiklerin birinci sınıfı olan geniş spektrumlu benzimidazollerin etki mekanizması, bir α -tubulin ile birlikte parazit hücrelerinde mikrotübül yapıları oluşturacak şekilde polimerize olan helminth β -tubulin'e yüksek afinite ile bağlanma yetenekleriyle ilişkilendirilmektedir (122). Mikrotübül oluşumunun bozulması, hücredeki mitoz ve transport gibi yaşamsal işlevleri engellemektedir. Sonuçta, benzimidazoller parazitin besin alımını engeller ve aynı zamanda ovisidal etki gösterir. Bu ilaçların etkisi doğrudan iyon kanallarına bağlananlardan (örneğin makrosiklik laktonlar) daha yavaş olmaktadır. β -tübülünün izotip-I ve izotip-II olarak adlandırılan farklı genlere ve birkaç allele sahip olan iki izotop nematodlarda identifiye edilmiştir. Benzimidazole dirençliliği, nematod popülasyonunda izotip-I allellerinin kademeli kaybı ve β -tubulin için izotip-II'nin tamamının kaybıyla ilişkilendirilmektedir (123). İzotip allellerinin sayısındaki bu azalma, túbülünün ilaca daha düşük bir afinite ile bağlanmasıyla dirençli bir fenotip üretir. *Haemonchus contortus* ve *Teladorsagia circumcincta* gibi koyun nematodlarında, benzimidazol direnci öncelikle izotip-I geninin 200. kodonunda bir fenilalanin-tirozin polimorfizmi ile ilişkilendirilmiştir (124). Bununla birlikte, son zamanlarda, farklı türler arasında benzimidazol dirençliliğinin değişebileceği ve başka bölgelerde de mutasyonların bulunduğu gösterilmiştir (125). Atların cyathostominlerinde

benzimidazole direnç mekanizması birden fazla mutasyon içermektedir. İzotip-1'in 167 ve 200 kodonları bu açıdan önemlidir (119, 126).

İlaçların ikinci sınıfı olan tetrahidropirimidinler, nematod kas hücrelerinin yüzeyindeki sinaptik ve ekstra-sinaptik nikotinik asetilkolin reseptörleri agonisti olup kasılmaya ve spastik felce neden olmaktadır (123). Tetrahidropirimidinlere karşı direncin, nikotinik asetilkolin reseptörlerindeki değişiklikten kaynaklandığı düşünülmektedir, ancak duyarlı ve dirençli parazitler arasındaki farklılıkların nedeni moleküler olarak hala netleşmemiştir (119, 125).

Üçüncü sınıf olan makrosiklik laktonlar, glutamate-aracılı klorür kanallarında glutamat agonistleri olarak görev yapmaktadır (120). Bu da, kas hücre membranı ve paralizin hiperpolarisasyonunu izleyen artmış bir klor geçirgenliğine yol açmaktadır. Nematod farenksinin bu ilaçlar için önemli bir hedef olduğu ve besin yetersizliğinin gerçek nematosidal etkisi olduğu ileri sürülmüştür (105, 120). Makrosiklik laktonlara karşı direnç mekanizması hala belirsizliğini korumaktadır, ancak ruminant trichostrongylid nematodları ve serbest yaşayan nematod *Caenorhabditis elegans*'a dayanılarak yapılan bazı hipotezler mevcuttur (119, 125). Neticede, antihelmintik direnç mekanizmalarının daha önceden inanılandan daha karmaşık olduğu ortaya çıkmıştır. Endoparazitlerin kemoterapötikler tarafından başarıyla kontrol edilmesi isteniyorsa, bu alanda daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır (25, 119).

2.10.3 Direnç için Seleksiyon

Bir ilacın maksimum (% 100) etkinliğinde hiçbir parazit hayatta kalmamakta ve direnç geliştirememektedir. Bununla birlikte, direnç kazandıran genlerin parazit popülasyonlarında doğal olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Kimyasal bileşikler duyarlı parazitleri ortadan kaldırırken, direnç kodlayan genlere sahip olanlar hayatta kalarak çoğalmaktadırlar. Kısa aralıklarla tedavide daha fazla ilaca maruz kalınmakta ve bu da direnç için seleksiyon oranını artırmaktadır. Zamanla, heterozigot dirençli bireylerin sıklığı, homozigot dirençli parazitler hakim oluncaya kadar azalmaktadır ve böylece ilaçlar parazitlerin çoğunluğu tarafından tolere edilmektedir. Dolayısıyla teoriye göre, fenotipik bakımdan son derece dirençli popülasyonlarda % 100'e yakın homozigot birey vardır. Direnç dominant bir gen ve / veya artan bir uyuma bağlı ise bu süreç

muhtemelen daha hızlı olmaktadır. Direnç oluştuktan sonra, popülasyon seçilen ilacın yokluğunda duyarlı duruma dönmemektedir (127).

Dirençliliğin ortaya çıkmasında parazit genetiği dışında önem taşıyan birçok önemli faktör bulunmaktadır. Parazitlerdeki jenerasyon süresinin kısa olması, popülasyonda dirençli allellerin daha hızlı birikmesine neden olmaktadır. Büyük strongiller de üreme periyodu, cyathostomin'lerden çok daha uzundur; bu da büyük strongyillerde direnç eksikliğine neden olan bir faktör olabilir. Bir diğer faktör ise, anthelmintiklere karşı direnç gelişimi üzerinde etkili olduğu bildirilen ilaçlara karşı direncin 'parazit refugium'u ile ölçülebileceği bildirilmektedir. Refugia antiparaziter tedavi sürecinde ilacın temas etmediği dolayısı ile ilaçlara duyarlı parazit popülasyonunun oranını tanımlamaktadır. Meradaki serbest yaşamlı strongyle larvaları, tedavi görmemiş hayvanlardaki parazitler ve tedavi edilse bile kist içerisinde bulunan ve ilaçla temasa gelmeyen hipobiotik larvalar bu grup içerisinde yer almaktadır. Refugia içerisindeki parazitlerde direnç gelişmediği için ilaçlara duyarlı gen alellerine sahiptir ve bunlar popülasyon içerisindeki dirençli gen alellerinin frekansının azaltılması açısından önemlidir. Yeterli parazit refugia'sının sağlanmasına bağlı olarak anthelmintiklere karşı direnç gelişimi engellenebilmektedir. (128). Cyathostominlerde pyrantel tedavinin, mukozal larvalar üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Öte yandan, larvisidal ilaçların, refugia popülasyonunu ve seçim baskısını azaltabildiği kaydedilmiştir. Ayrıca bilgisayar modelleri moksidektin gibi uzun etkili ilaçların ilaç eliminasyon fazında parazitlere karşı sub-töröpatik dozlardaki etkisi nedeni ile kısa etkili bileşiklere göre direnç için daha fazla strongyle seçtiğini göstermiştir (129).

2.10.4 Dirençliliğin Saptanması

Antihelmintik direncin saptanması için çeşitli in vivo ve in vitro testler mevcuttur. Bu testlerin tümü hassasiyet, yorumlama, güvenilirlik ve maliyet bakımından bazı dezavantajlarla ilişkilendirilmiştir.

Kontrollü test, antihelmintik etkinliği değerlendirmek için en güvenilir yöntemdir, ancak yüksek maliyetten dolayı nadiren kullanılır. Enfekte atlar tedavi altındaki ve tedavi edilmemiş gruplar olarak rastgele ayrılır. İlaç uygulandıktan 1-2 hafta sonra hayvanlar ötenazi edilir ve nekropsi yapılır. İlacın etkinliği, tedavi edilen atlardaki parazit sayısı ile tedavi edilmemiş atlardaki parazit sayısının karşılaştırılmasıyla tespit edilir (25, 119).

Kritik bir testte bireysel enfekte hayvanlar kendi kontrolleri olarak kullanılırlar. İlaç kullanımını takiben, nekropsi yapılana kadar dışkılar günlük olarak toplanır. Toplanan parazitlerin sayısı hesaplanır ve parazitlerin total sayısı ile karşılaştırılır, diğer bir deyişle dışkıdan toplanmış parazitler + nekropside geriye kalan parazitler (25, 119).

Dışkıda yumurta sayısı azalım testi (FECRT), at sürülerinde antihelmintik direncin varlığını saptamak ve belirlemek için en sık kullanılan yöntemdir. FECRT antihelmintik tedaviden önce ve 10-14 gün sonra hesaplanır, ve daha sonra belli dirençlilik kriterlerine göre değerlendirilir. “*The World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP)*” tektırnaklıların nematodlarında antihelmintik direncin saptanması için öneriler yayınlamıştır (130). Bildirilen çalışmalara istinaden bu yöntemler benimsenmemiştir; ancak direncin durumunu, hesaplamanın ve yorumlamanın sayısız yolu önerilmiştir. FECRT uygulanması kolaydır, fakat pozitif yumurta sayısına sahip birçok hayvan gerekir, bunun da elde edilmesi zor olabilir. Ayrıca duyarlılığı düşüktür; FECRT analizinden önce, bir popülasyondaki nematodlardan en az % 25'i dirençli olmalıdır (131).

Antihelmintik direnç in vitro yöntemlerle de saptanabilir, bunlardan yumurta açılım testi (EHA) en yaygın kullanılanıdır. EHA benzimidazol dirençliliğinin belirlenmesi için geliştirilmiştir, çünkü bu antihelmintik sınıfı, strongyle yumurta embriyasyonunu ve kuluçka işlemini önler. Yumurtalar, artan seri antihelmintik konsantrasyonlarda inkübe edilir ve her bir konsantrasyondaki kuluçka yüzdesini hesaplayarak bir doz-yanıt eğrisi ve bir EC50 değeri (yumurtaların% 50'sini öldürmek için gerekli konsantrasyon) elde edilebilir. Bu metodun uygulanabilmesi için yumurtaların gelişmemiş olması gerekir. Bu durumda ilgili tekniğin rutin teşhislerde kullanımını sınırlar. FECRT’de olduğu gibi, EHA sadece % 25'in üzerindeki direnç seviyelerini tespit eder (131).

Larval gelişim testi (LDA), araştırılan ilacın gelişim gösteren larva üzerine etkinliğini ölçen diğer bir tekniktir. Yumurtalar, üç ilacın her bir sınıfından farklı antihelmintik konsantrasyonlarını içeren mikropleytte yedi gün boyunca inkübe edilir. Her bir antihelmintik için, L3’ün gelişim yüzdesi her konsantrasyon için hesaplanır ve daha sonra doz-yanıt ve LC50 değeri (larvaların % 50'sinde L3’ün gelişmesinin inhibe edildiği konsantrasyon) belirlenir. LDA’nın avantajı, farklı etkiye sahip antihelmintiklerin eşzamanlı test edilebilir olmasıdır. Bu test, koyun sürülerinde yürütülen çalışmalarda da

başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Fakat tektırnaklıların strongylleri için LDA'nın, yorumlama, güvenilirlik ve tekrarlanabilirlik problemleriyle ilişkilendirildiği görülmektedir (119, 132).

Genetik testler, bir nematod popülasyonunda dirençli allellerin varlığını tespit eder. Bu testlerin dizaynı, antihelmintik direncin moleküler ve biyokimyasal mekanizmaları hakkında bilgi gerektirir, fakat bu zamana kadar çok iyi anlaşılamamıştır. Larval paraliz testi, motilite testleri, migrasyon testleri ve biyokimyasal testler gibi diğer testler de vardır. Ancak bunlar at nematodlarında çok sık kullanılmamaktadır (25, 119, 132).

2.10.5 At Strongylidlerinde Dirençlilik Durumu

Cyathostomin popülasyonunda, FECRT ile saptanan benzimidazol direnci tüm dünyada yaygın olup, bu ilaçların kullanıldığı tüm alanlarda bulunması muhtemeldir. En sık görülen cyathostomin türlerinden 10'un üzerinde türün dirençli popülasyonlar oluşturduğu gösterilmiş (25, 133), cyathostomin türlerinin büyük bir çoğunluğunun, artan seleksiyon basıncının uygulandığı durumlarda biriken dirençli genotipler içerdiği öne sürülmüştür (119).

Pyrantel bileşikler, 1970'lerden beri at strongyllerine karşı yaygın olarak kullanılmıştır. Yine de, ABD'de 1996'ya kadar, pyrantale karşı direnç bildirilmemiştir (134). Norveç, Danimarka ve ABD'nin güneyindeki araştırmalar da benzer sonuçları göstermiştir (135-137). Dirençliliğin, pirantele karşı yavaş gelişmesi kısmen, tedaviyi takiben bağırsaklarda kalan nematodların duyarlı genotiplerinin oranıyla (0-10%), dolayısıyla da dirençli genotiplerin seyreltilmesi ile ilişkili olabilir (25).

Benzimidazol ve pyrantel dirençliliğinin olduğu at işletmelerinde etkili olan tek antihelmintik sınıfı, makrosiklik laktonlar olarak tanımlanmıştır. Uzun yıllardır aşırı kullanımına rağmen, 2000'li yılların başlarına kadar at strongyllerinde ivermektine karşı dirençlilik bildirilmemiştir. Ancak son yıllarda FECRT veya yumurta tekrar görülüm periyodu kısalması (ERP) gibi dirençlilik analizlerinde (138-141) ivermectin dirençli olgular izole edilmiş ve bu durum da strongyle nematodların ivermectin grubuna dirençliliği üzerine ilk indikatörler olmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 SAHA ÇALIŞMALARI

3.1.1 Araştırma Sahası ve Dışkı Örneklerinin Toplanması

Çalışmada, 2016 yılının Mart-Haziran ayları arasında Nevşehir'in farklı bölgelerindeki çiftliklerde (Şekil 3.1) bulunan toplam 150 arap atı araştırma grubunu oluşturmuş ve dışkı örnekleme yapılmıştır. İncelenen atların yaş ve cinsiyete göre dağılımları Tablo 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 Örnekleme yapılan atların bulunduğu çiftliklerin Nevşehir ilindeki lokalizasyonları

Tablo 3.1 Nevşehir yöresinde örneklenen atların yaş grupları, cinsiyet ve ırklarına göre dağılımları

Araştırma Yöresi	At sayısı						
	Yaş Grupları			Cinsiyet		İrk	Toplam
	≤10 yaş	11-15 yaş	≥16 yaş	Erkek	Dişi	Arap	
Nevşehir	41	76	33	10	140	150	150

Hayvanların rektumundan tekniğine uygun şekilde alınan dışkı örnekleri, steril dışkı kaplarına aktarılarak, protokol kayıtları yapılmış ve soğuk zincirde laboratuvara intikalleri sağlanmıştır.

3.2 LABORATUVAR ÇALIŞMALARI

3.2.1 Konvansiyonel Dışkı Muayenesi

Laboratuvara getirilen örnekler strongyle yumurtalarının varlığı yönünden Duszynski ve Wilber (142) tarafından bildirilen tekniğin modifiye edilerek kullanılmasıyla analize tabii tutulmuştur. Dışkı örneklerinden 3 gr tartılmış doymuş şekerli su (Sheather's sugar solution) (spesifik gravite: 1,27) ile homojen hale getirilerek steril gazlı bezler yardımıyla 15 ml santrifüj tüplerine süzölmüştür. Tüpler üzerine lamel kapatılarak 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş sonrasında oda ısısında 5 dk beklenerek lameller lam üzerine alınıp ışık mikroskobunda yumurtalar yönünden incelenmiştir. İnceleme esnasında tüpler üzerine tekrar lamel kapatılarak 5-10 dk beklenmiş ve akabinde ikinci lamel de incelemeye tabii tutulmuştur.

3.2.2 Gram Dışkıdaki Yumurta Sayısının (EPG) Belirlenmesi

Strongyle yumurtaları yönünden pozitif bulunan dışkı örneklerinde gram dışkıdaki yumurta sayısının (EPG) belirlenmesinde ilgili protokol modifiye edilerek uygulanmıştır (143). Buna göre;

- 3 gr dışkı örneği tartılarak içerisinde 42 ml çeşme suyu konulan steril dışkı kabına alınmıştır.
- Bir bagetle karışım homojen olana dek karıştırılmış ve 30 dk oda ısısında bekletilmiştir (karışım bu süre içerisinde 10 dk da bir tekrar karıştırılmıştır).
- Süre sonunda karışım tekrar bagetle karıştırıp bekletmeden diğer temiz bir dışkı kabına steril sargı bezi kullanılarak süzölmüştür.

- Sonrasında beklemeden bu kaptaki süspansiyondan 15 ml steril santrifüj tüpünün 10 ml çizgisine kadar doldurulmuş ve tüpün ağzı kapatılmıştır (15 ml 1 gr dışkı ise 10 ml 2/3gr hesabı ile).
- Sonra tüpler 1500 rpm’de 5dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonunda sediment oynatılmadan 10 ml disposable pipetle süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Sedimet üzerine 4 ml çizgisine kadar flotasyon solüsyonu ilave edilip 1000 µl pipet ile homojen hale getirilmiş ve hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilmiştir (4ml solüsyonda 2/3gr dışkı).
- Hiç bekletmeden aynı pipet ucu ile McMaster lamının 2 kamerası doldurulmuştur.
- 5 dk inkubasyon süresinden sonra McMaster lamı mikroskop altında 10X objektif kullanılarak incelenmiş ve strongyle yumurta sayımı yapılmıştır.
- Her iki kameradaki çizgili dikdörtgen alanlar içindeki yumurtalar ayrı ayrı sayılmış ve toplamı alınmıştır. Çizgili alan dışındaki yumurtalar dikkate alınmamış, çizgi üzerine gelmiş yumurtaların 1/2’si alan içinde ise sayıma dahil edilmiştir.
- EPG değerini hesaplanmasında McMaster kamerasının üst ve alt camları arasındaki mesafe (0,15 cm) ve her iki sayım alanı (1x1cm) dikkate alınarak iki sayım alanının altındaki fekal süspansiyon volümü belirlenmiştir ($2 \times 0,15 \text{ ml} = 0,3 \text{ ml}$).
- Yukarıda da belirtildiği üzere 4 ml fekal süspansiyon 2/3 gr dışkı örneğini temsil etmektedir. Böylece sayım yapılan 0,3 ml süspansiyon doğru orantı ile 1/20 gr dışkıyı nitelemektedir.
- Sonuçta iki kameradaki toplam yumurta sayısı 20 ile çarpılıp EPG değeri bulunmuştur.

3.3 MOLEKÜLER ANALİZLER

3.3.1 Strongyle Pozitif Örneklerde Yumurta Süspansiyonlarından Genomik DNA İzolasyonu

Strongyle yumurtaları ile pozitif belirlenen atlara ait dışkı örneklerinden genomik DNA izolasyonu için Yıldırım ve ark. (144) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Takip edilen basamaklar;

- Dışkı örneğinden karıştırıldıktan sonra 4 gr tartılarak içerisinde 42 ml distile su olan steril dışkı kabına aktarılmıştır.

- Steril baget ile homojen olana dek karıştırıldıktan sonra steril gazlı bez ile steril cam huni yardımıyla 50 ml falkon tüpe süzülerek üzerine 50 ml olacak şekilde steril distile su eklenmiştir.
- Süspansiyon 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda 2 ml sediment bırakılarak süpernatant dikkatlice atılmıştır.
- 2 ml çöküntü üzerine tekrar 50 ml olacak şekilde steril distile su eklenerek 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonunda 2 ml bırakılarak süpernatant dikkatlice atılmış ve bu sediment 15 ml santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- Üzerine 15 ml tamamlayacak şekilde doymuş şekerli su eklenerek kapağı kapatılıp 1500 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonunda tüpler üzerinde şekerli su ile bombe oluşturulup üzerine taşırmayacak şekilde lamel kapatılmış ve tüpler 10 dk oda ısısında bekletilip süre sonunda lamel alınarak steril distile su ile her defasında 100 ul olacak şekilde 2 ml mikrosantrifüj tüplerine yıkanmıştır.
- Tüpler üzerine tekrar lamel kapatılarak aynı işlem ikinci kez tekrarlanmıştır.
- Mikrosantrifüj tüpler steril deiyonize su ile 2 ml’ye tamamlanarak ultra santrifüjde 15.300 rpm’de 3 dk santrifüj edilerek yumurtaların çökmesi sağlanmıştır.
- Santrifüj işlemi sonrasında dikkatlice süpernatant uzaklaştırılarak ependorf tüp içerisinde 120 µl hacimde yumurta süspansiyonu bırakılmıştır.
- Genomik DNA izolasyonuna geçmeden önce her bir örneğe ait yumurta süspansiyonu spin-vortekslenerek homojenize hale getirildikten sonra 10’ar µl iki kez örnek alınarak lam lamel arasında ışık mikroskopunda yumurta varlığı yönünden konfirme edilmiş ve yumurta sayımı yapılmıştır.
- Sonraki basamakta, elde edilen yumurta süspansiyonları 0,5 mm cam boncuklarla 5 dk homojenizatörde (Tissue Lyser LT; Qiagen) mekanik parçalanmaya tabii tutulmuştur.
- Sonrasında tüpler birer dakika olmak üzere 8 siklus sıvı azot ve kaynar suda tutularak yumurtaların tamamen parçalanması sağlanmıştır.
- Daha sonra süspansiyon genomik DNA ekstraksiyon kitleri (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific; QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen) ile DNA ekstraksiyonuna basamaklar modifiye edilerek alınmıştır.

- Final basamakta elüsyon 30 µl'ye ayarlanmıştır.
- Elde edilen genomik DNA ekstraktlarından alınan örnekler Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek DNA izolasyon etkinliği ve total genomik DNA miktarları (ng/µl) belirlenmiştir.
- Örneklere ait genomik DNA'lar kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.2 Ribosomal RNA Internal Transcribed Spacer (ITS)-1, 5.8S, ITS-2 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Strongyle yumurta süspansiyonlarından elde edilen DNA ekstraktları ribozomal ITS-1, 5.8S, ITS-2 bölgelerini tüm olarak ayrıca 28S rRNA gen bölgesinden 50 nükleotide içine alan gen fragmentini amplifiye eden NC5 (5'-GTAGGTGAACCTG CGGAAGGATCATT-3') ve NC2 (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3') primerleri ile PCR'da amplifikasyona tabii tutulmuştur (145). PCR reaksiyonu 25µl final konsantrasyonda hazır kullanımlık Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), 0.4 µM her bir primer ve 10-20 ng kalıp DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Laminar kabin içerisinde steril şartlarda hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 0,5 ml'lik DNA'se ve RNA'se free ependorf tüpleri içerisine konulmuştur. Tüpler C1000 Touch thermalcycler cihazına (BioRad) yerleştirilerek, termal profil 94°C'de 5 dk; 30 siklus 94°C'de 1 dk, 52°C'de 40 sn, ve 72°C'de 90 sn; 72°C'de 15 dk olarak ayarlanmış ve amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında mevcut standardize edilmiş referans örneklere (*Haemonchus contortus* ve *Ostertagia ostertagi*) ait genomik DNA'lar, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonların görüntülenmesi amacıyla yatay elektroforez tankı (BioRad) kullanılmıştır. Toplam hacim 1 lt olacak şekilde; 980 ml deiyonize su üzerine 20 ml 1XTAE (Tris-acetate-EDTA) buffer eklenerek elde edilen solüsyon, hem jel hazırlanmasında hem de elektroforez tankının içerisinde doldurulmasında kullanılmıştır. Ürünlerin görüntülenmesinde %1,5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin her birinden 10 µl alınıp 90 V'da 50 dk, jel elektroforeze tabii tutulmuştur. Sonuçlar Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Upland, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.3.3 Real Time PCR Analizleri

Strongylid yumurtaları yönünden mikroskopik olarak pozitif belirlenen ve ribozomal ITS-1, 5.8S, ITS-2 bölgesi yönünden PCR’da amplifikasyon gösteren örnekler ait genomik DNA izolatlarında *Strongylus vulgaris* identifikasyonu için bu örnekler iki ayrı Real Time PCR metodolojisi ile analiz edilmiştir.

İlk metodolojide Nielsen ve ark. (13, 14) tarafından bildirilen protokol takip edilmiş ve genomik DNA ekstraktları *S. vulgaris*’in ribozomal ITS-2 gen bölgesini hedef alan spesifik primerler (SvulF- 5’-GTATACATTAAATAGTGTCCCCATTCTAG-3’; SvulR- 5’-GCAAA TATCATTAGATTTGATTCTTCCG-3’) ve TaqMan prob (SvulP- 5’-FAM-TGGATTTATTCTCACT ACTTAATTGTTTCGCGAC-BHQ-3’) kullanılarak Real Time PCR’de analiz edilmiştir.

Real Time PCR analizleri CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, ABD) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR master mix (SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix, BioRad, ABD) üreticinin açıklamalarına göre toplam 20 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

2X Master Mix	10 µl
Forward primer (20 µM)	0,5 µl
Reverse primer (20 µM)	0,5 µl
Prob (20 µM)	1,0 µl
Genomik DNA (20-30 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	7 µl

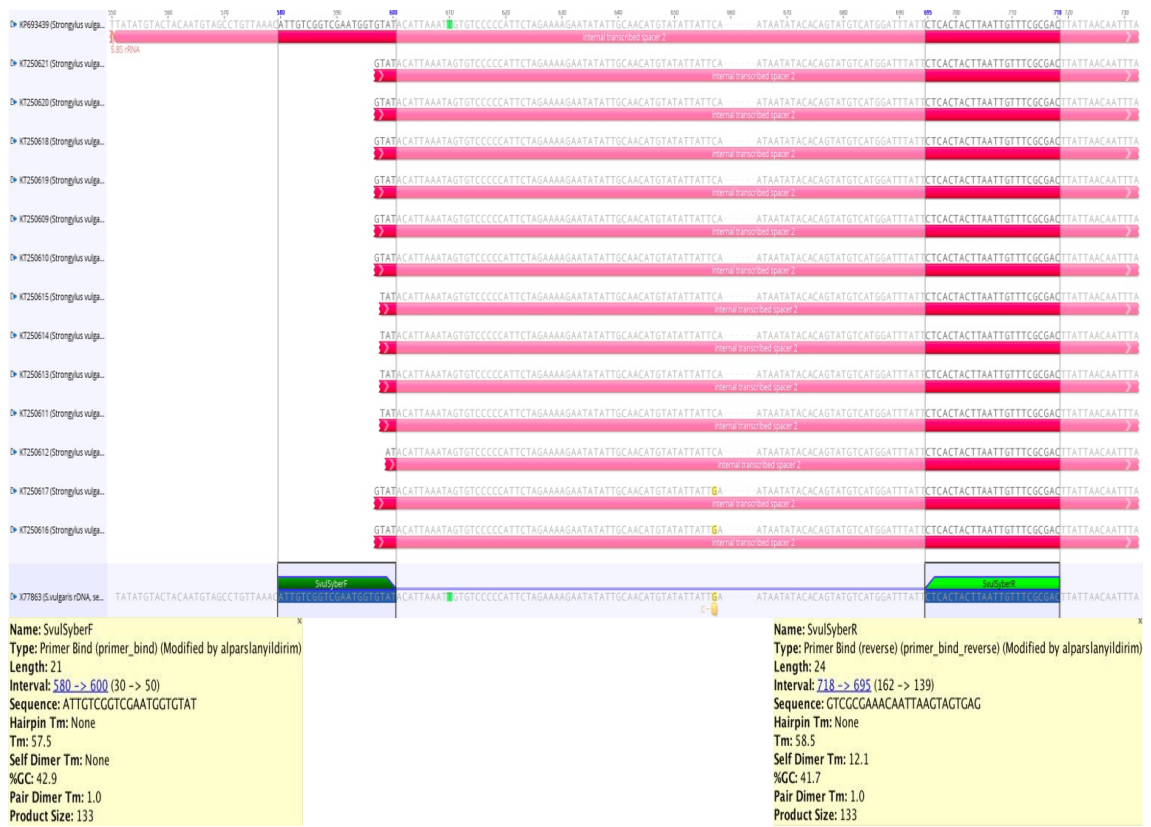
PCR geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; sentetik olarak sentezlenen referans genomik DNA’lar (Sentegen) pozitif kontrol, sterilize edilmiş deiyonize su ise negatif kontrol olarak tüm reaksiyonlarda kullanılmıştır. Reaksiyonlar için termal profil polimeraz aktivasyonu ve ön DNA denatürasyonu için 98°C’de 3 dk bir siklus, denatürasyon için 98°C’de 15 sn, bağlanma için 55°C’de 30 sn 40 siklus olarak ayarlanmıştır. Real Time PCR analizi sonunda

örneklerdeki pozitiflikler ve kantitatif değerler, CFX Manager (BioRad, ABD) yazılımında analiz edilmiş ve amplifikasyon eğrileri ve Cq (Eşik değer siklusu) verilerine göre değerlendirilmiştir.

İkinci metodolojide *S. vulgaris*'in kantitatif identifikasyonu için ribozomal ITS-2 bölgesini hedef alan primerler (Tablo 3.2) dizayn edilerek sybergreen tabanlı Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle GenBank veri tabanında mevcut *S. vulgaris* nesillerine ait referans ITS-2 sekansları Geneious R10 (Kearse vd., 2012) yazılımı üzerinden MAFTT (Kato vd., 2002) plugin kullanılarak hizalama analizlerine tabii tutulup primerler için uygun bağlanma bölgeleri belirlenmiştir (Şekil 3.2). Ayrıca dizayn edilen primerlerin spesifikite konfirmasyonları primer blast veri tabanında (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) yapılmıştır. İkincil yapılar ve primer dimer formasyonları da OligoAnalyzer3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) ve Geneious R10 (146) yazılımı üzerinden kontrol edilmiştir. Dizayn edilen primerlerin in silico analizlerinde ITS-2 geninin 133 bp bölgesini amplifiye ettiği ve türe özgü olarak Tm (erime sıcaklığı) farklılıklarına yol açabilecek çeşitli nükleotid farklılıklarını içerdiği belirlenmiştir (Şekil 3.2).

Tablo 3.2 *S. vulgaris* ITS-2 gen bölgesinden dizayn edilen Sybergreen real time PCR için primer sekansları ve özellikleri

Primer	Dizilimi (5'---3')	TM (°C)	Amplikon büyüklüğü
SvulSyberF	ATTGTCGGTCGAATGGTGTAT	50,5	133 bp
SvulSyberR	GTCGCGAAACAATTAAGTAGTGAG	54,0	



Şekil 3.2 *S. vulgaris* ITS-2 gen bölgesinden dizayn edilen sybergreen real time PCR için primer çifti, bağlanma spesifiteleri ve özellikleri

Real Time PCR analizleri CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, ABD) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR master mix (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, BioRad, ABD) üreticinin açıklamalarına göre toplam 20 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

2X Master Mix	10 µl
Forward primer (20 µM)	0,5 µl
Reverse primer (20 µM)	0,5 µl
Genomik DNA (20-30 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	8 µl

Reaksiyonlar için termal profil polimeraz aktivasyonu ve ön DNA denatürasyonu için 98°C’de 3dk bir siklus, denatürasyon için 98°C’de 15sn, bağlanma için 55°C’de 20 sn 40

siklus olarak ayarlanmış, akabinde erime eğrisi (melt curve) analizleri için termal profil 65-95°C arası her 2sn'de 0,5°C artış olacak şekilde programlanmıştır. Erime eğrileri CFX Manager (BioRad, ABD) yazılımında analiz edilmiş ve T_m (melt temperature) değerleri elde edilen eğrilerin pik noktasına göre belirlenmiştir.

Real time PCR tekniğinin optimizasyonu ve standart eğrinin oluşturulması için araştırma yöresinde atlarda sekans analizleri ile karakterize edilmiş *S. vulgaris* ITS-2 gen bölgesini ihtiva eden plazmid DNA, aşırı sarmallaşmış (supercoiled) plazmid DNA'nın olumsuz etkisinden kaçınmak için Eco88I (AvaI) (Thermo Scientific, ABD) restriksüyon enzimi ile linearize hale getirilmiştir. Linearize plazmid agaroz jelden pürifiye edildikten sonra Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies, ABD) cihazında µg/ml düzeyinde konsantrasyonu ve saflığı ölçülerek kaydedilmiştir. Daha sonra molar konsantrasyon düzeyinde linearize edilmiş plazmitin mikrolitresindeki DNA kopya sayısı belirlenmiş ve 1 µl template için 10⁷-10¹ hedef kopya olacak şekilde 10 tabanında dilüsyonları hazırlanmıştır. Dilüsyonlar yukarıdaki protokole göre iki tekrarlı çalışılmış ve Ct değerlerine göre standart eğriler oluşturulmuştur. Testin etkinliği (E) standart eğri slopuna göre ($E = (10^{-1/\text{slope}})$) CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, ABD) cihazında ilgili yazılım ile hesaplanmış ve yüzde olarak ifade edilmiştir. İlgili tekniğin spesifite analizlerinde çalışmada başka türlere ait belirlenen linearize plazmid DNA'ların yanısıra Anabilim Dalında mevcut *H. contortus* ve *O. ostertagi* genomik DNA izolatları ile Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.4 Klonlanma ve Plazmid Pürifikasyonu

Strongylid yumurtaları ile pozitif belirlenen ve ribozomal ITS-1, 5.8S, ITS-2 gen bölgesi yönünden PCR'da amplifikasyon gösteren örneklerle ait yumurta süspansiyonlarından elde edilen genomik DNA'larda *S. vulgaris* DNA'larının varlığı real time PCR tekniği ile araştırılmıştır. Belirlenen Ct (dR) verilerine göre sekans analizleri için *S. vulgaris* DNA'sı içeren uygun izolatlar ayrılmıştır. Bu izolatların PCR ürünleri agaroz jel üzerinden High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak pürifiye edilmiştir. Bu pürifiye ampikonlar rekombinant plazmid eldesi için klonlama basamaklarına alınmıştır.

Ligasyon basamağı: Jel pürifiye örneklerin klonlanmasında CloneJET PCR Clonning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Klonlama reaksiyonu kullanıcının önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanmış ve yapılmıştır:

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

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

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

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

LB katı besiyerinde üreyen her bir koloni steril pipet uçları ile alınarak yeniden LB katı besiyeri bulunan ve işaretlenerek dörde bölünmüş pleytlerin her bir işaretli bölmesine bir koloni olacak şekilde ekilmiş ve 37°C’de 1 gece daha inkübasyona bırakılarak ilgili kolonilerin çoğaltılması sağlanmıştır.

Koloni Screening Real Time PCR: LB katı besiyerinde üreyen kolonilerden rekombinant *S. vulgaris* plazmitini içerenlerin belirlenmesi için işaretli bölmelerden alınan koloniler sybergreen real time PCR’da *S. vulgaris* identifikasyonu için analiz edilmiştir. Sybergreen real Time PCR analizleri yukarıda açıklanan şekilde uygulanmış genomik DNA yerine steril pipet ucu ile alınan koloni örnekleri kalıp olarak kullanılmıştır. Analizler sonucu farklı örneklerle ait *S. vulgaris* DNA’sı içerdiği belirlenen 10 koloni ve

S. vulgaris DNA'sı olmadığı belirlenen diğer bir 10 koloni seçilerek rekombinant plazmid izolasyonuna gidilmiştir.

Plazmid DNA: İlgili kolonilerden rekombinant plazmid DNA elde etmek için LB katı besiyerinden steril özeler ile alınan koloniler ampisilinli 5 ml'lik LB sıvı besi yerlerine ekimi yapılarak 37°C'de sallayıcı üzerinde bir gece inkübe edilmiştir. Üreme gözlenen sıvı besi yerlerinden alınan örnekler 2 mL'lik ependorflar içerisine alınarak 6000g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım dökülüp hücresel pelet GeneJET Plazmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) ile plazmid pürifikasyonuna alınmış, aynı örneklerle ait diğer bir kısım hücresel pelletler ihtiyaç halinde kullanılmak üzere -20°'de muhafaza altına alınmıştır. Elde edilen plazmidler insertlerin varlığı yönünden vektör spesifik pJET1.2 forward ve pJET1.2 reverse primerleri ile prosedürüne uygun olarak PCR'da analize tabi tutulmuştur. Plazmid DNA'lar sekans analizlerine kadar -20°'de saklanmıştır.

3.3.5 Sekans ve Filogenetik Analizler

Hedef ribozomal ITS-1, 5.8S, ITS-2 gen bölgesini ihtiva eden rekombinant plazmid DNA'lar vektör spesifik pJET1.2 forward ve reverse primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious R10 (146) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin ikili hizalamaları yapılarak, vektör nükleotid dizisi içerisinde, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlenerek izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Filogenetik analizler amacı ile elde edilen ribozomal DNA sekanslarında ITS-2 gen bölgesi sekansları kullanılmıştır. ITS-2 sekanslarının Geneious R10 yazılımı (146) üzerinden BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması kullanılarak mevcut homolog veya yakın izolatlara ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla çoklu hizalamaları yapılarak moleküler karakterizasyonları sağlanmış ve akabinde GenBank kayıtları sağlanmıştır. Çalışmada karakterize edilen izolatlarda DNA polimorfizmi ve haplotip yapısının belirlenmesinde DnaSP 5.10.01 (147) yazılımı kullanılmıştır. Intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar Kimura two-parameter (K2P) uzaklık modeli (148, 149) kullanılarak MEGA 7 yazılımında (150) gerçekleştirilmiştir. *S. vulgaris* ve diğer belirlenen strongyle türlerin filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde Bayesian inference (BI) ve Maximum Likelihood (ML) analizleri uygulanmıştır. BI ve ML analizlerinde sekans evrimi için en uygun substitution modelin belirlenmesinde jModelTest v.0.1.1 (151) kullanılmış ve en

düşük AIC (Akaike Information, Criterion, correction) değerine sahip belirlenen modeller filogenetik ağaçların oluşturulmasında kullanılmıştır. BA ve ML analizleri Geneious R10 (146) yazılımı üzerinden sırasıyla MrBayes (152) ve PhyML (153) pluginler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. BA analizlerinde, Markov Chain Monte Carlo taramaları 1.100,000 jenerasyon için 4 zincirle ve ağaç örnekleme her 200 jenerasyonda bir (ilk 100,000 ağaç) “burn in” olarak çıkarılmıştır. ML analizleriyle oluşturulan ağaçların güvenilirliğinin tespit edilmesinde 1000 tekrarlı Bootstrap testi kullanılmıştır.

3.4 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistik analizler IBM SPSS Statistics 20 yazılımında gerçekleştirilmiştir. İncelenen atlarda strongyle prevalansı ve *S. vulgaris* moleküler prevalansı ile yaş ve cinsiyet faktörlerinin ilişkisi, Pearson’s Chi Square ve Fisher’s Exact testleriyle araştırılmıştır. Strongylid yumurtaları yönünden pozitif örneklerde EPG değerleri ile atların yaş ve cinsiyet faktörlerinin ilişkisi ANOVA ve Independent Samples T testiyle araştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 KONVANSİYONEL DIŞKI MUAYENESİ SONUÇLARI

Konvansiyonel dışkı muayenesi sonucunda, incelemesi yapılan toplam 150 atın 98'i (%65,3) sytrongylid yumurtaları (Şekil 4.1) yönünden pozitif bulunmuştur. Strongylid yumurtaları ile pozitif belirlenen atların yaş ve cinsiyete göre dağılımları Tablo 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Dışkı örneklerinde belirlenen strongylid yumurtaları

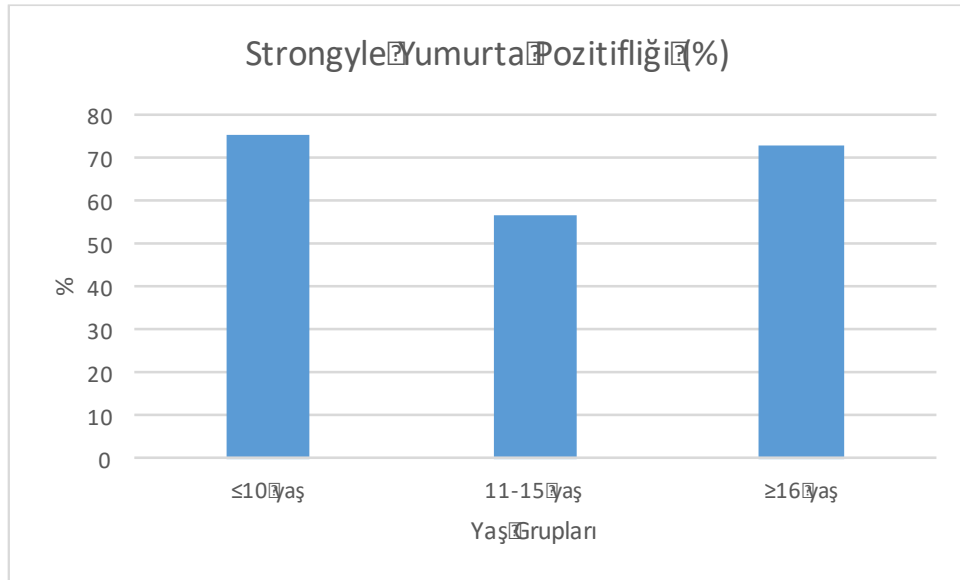
Tablo 4.1 Strongylid yumurtaları ile pozitif belirlenen atların yaş ve cinsiyete göre dağılımları

Faktör									
Yaş	Cinsiyet						Toplam		
	Erkek			Dişi					
	İH	PH	%	İH	PH	%	İH	PH	%
≤10 yaş	4	4	100,0	37	27	73,0	41	31	75,6
11-15 yaş	5	2	40,0	71	41	57,7	76	43	56,6
≥16 yaş	1	0	0,0	32	24	75,0	33	24	72,7
Toplam	10	6	60,0	140	92	65,7	150	98	65,3

İH: İncelenen hayvan sayısı

PH: Pozitif hayvan sayısı

Tablo 4.1’de görüleceği üzere yaş gruplarına göre strongylid yumurtaları ile pozitiflik en yüksek %75,6 ile ≤10 yaş grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla %72,7 ve %56,6 ile ≥16 yaş ve 11-15 yaş grupları izlemiştir. Atların yaş gruplarına göre strongylid pozitifliğinin dağılımı ayrıca Şekil 4.2’de verilmiştir. Yaş gruplarına göre strongylid yumurta pozitifliğinin dağılımında istatistiksel açıdan (Tablo 4.2) önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

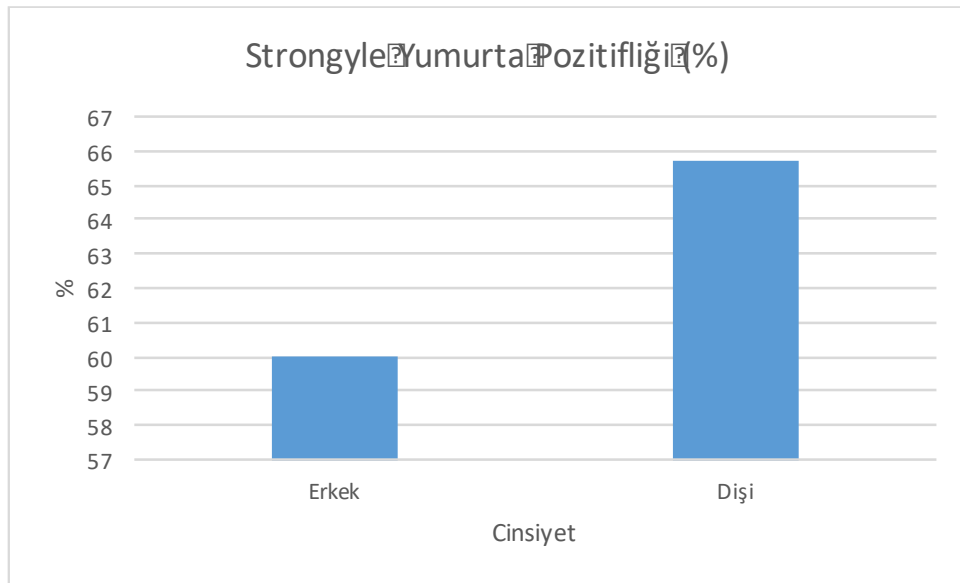
**Şekil 4.2** Atların yaş gruplarına göre strongylid yumurta pozitifliğinin dağılımı

Tablo 4.2 Yaş gruplarına göre strongylid yumurta pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Ki-Kare Testi			
	Değer	df	Asymp. Sig. (2-yönlü)
Pearson Chi-Square	5,280	2	,071*
Likelihood Oranı	5,342	2	,069
Linear-Linear İlişki	0,187	1	,665
Geçerli olgu sayısı	150		

*p>0,05

Atların cinsiyetine göre erkeklerde %60,0 dişilerde ise %65,7 oranında strongylid yumurta pozitifliği belirlenmiştir. Atların cinsiyetine göre strongylid yumurta pozitifliğinin dağılımı ayrıca Şekil 4.3’de verilmiştir. Cinsiyete göre strongylid yumurta pozitifliğinin dağılımında istatistiksel açıdan (Tablo 4.3) önemli bir farklılık bulunmamıştır (p>0,05).

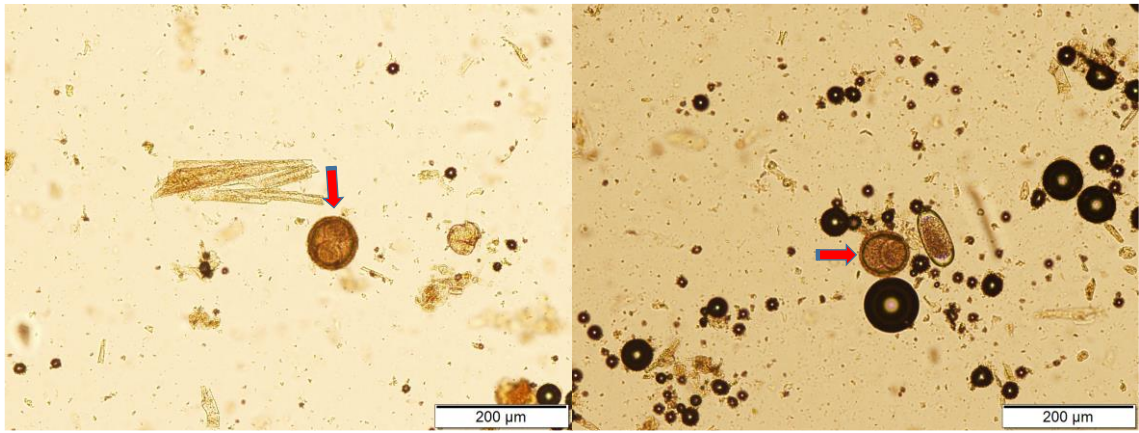
**Şekil 4.3** Atların cinsiyetine göre strongylid yumurta pozitifliğinin dağılımı**Tablo 4.3** Atların cinsiyetine göre strongylid yumurta pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Ki-Kare Testi					
	Değer	df	Asymp. Sig. (2-yönlü)	Exact Sig. (2-yönlü)	Exact Sig. (2-yönlü)
Pearson Chi-Square	,0135 ^a	1	,714		
Continuity Correction ^b	,001	1	,982		
Likelihood Oranı	,132	1	,716		
Fisher's Exact Test				,739*	,478

Linear-Linear İlişki	,134	1	,715		
Geçerli olgu sayısı	150				

* $p>0,05$

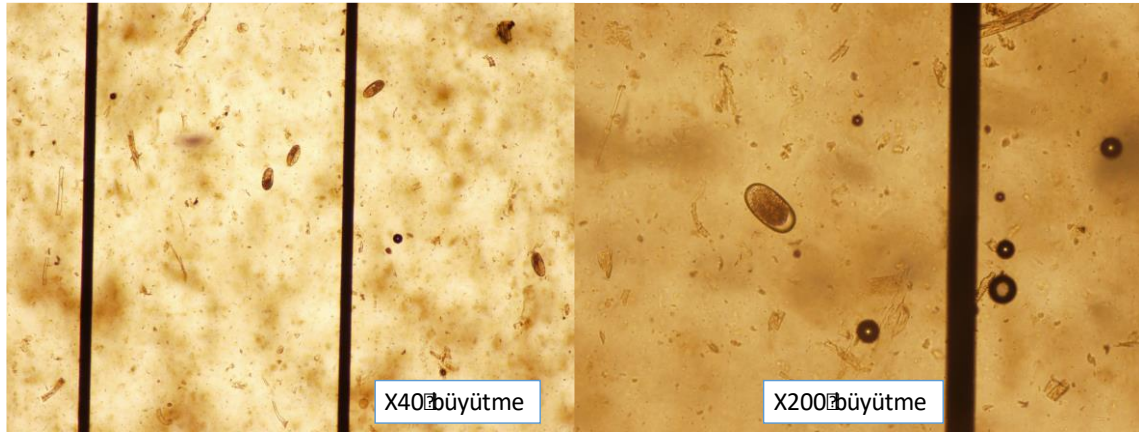
Ayrıca araştırmada konvansiyonel dışkı muayenesi sonuçlarına göre incelemesi yapılan atların 19’unda *Parascaris equorum* yumurtaları (Şekil 4.4) belirlenmiş ve ilgili nematodun prevalansı %12,7 olarak tespit edilmiştir. *P. equorum* pozitif belirlenen 19 atın 13’ünün strongyle enfeksiyonlarıyla miks seyrettiği belirlenmiştir. İncelenen atlarda dışkı muayenesinde başka parazitler formlara rastlanmamıştır.



Şekil 4.4 Dışkı örneklerinde belirlenen *P. equorum* yumurtaları

4.2 GRAM DIŞKIDAKİ YUMURTA SAYISI (EPG) VE İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

McMaster sayım kamerasında belirlenip yumurta sayımı (Şekil 4.5) yapılan 98 strongyle pozitif atta ortalama EPG değeri $551,9 \pm 119,9$ belirlenmiştir. EPG değerlerinin atların yaş gruplarına göre dağılımları Tablo 4.4’de verilmiştir. Tablo 4.4’de görüleceği üzere ortalama EPG değeri en yüksek ≤ 10 yaş grubunda belirlenmiş bunu 11-15 yaş ve ≥ 16 yaş grupları izlemiştir (Şekil 4.6). Yaş grupları arasındaki istatistiksel farklılık önemsiz ($p>0,05$) belirlenmiştir (Tablo 4.5).

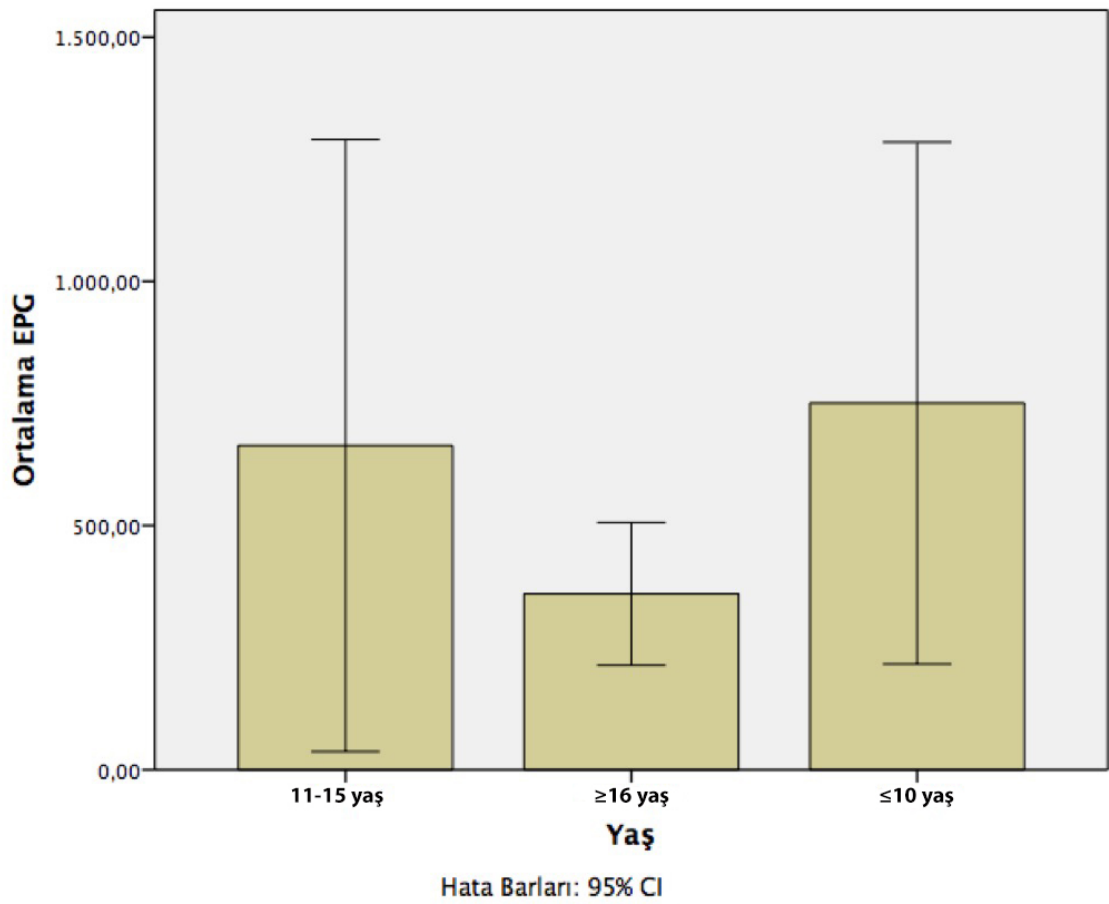


Şekil 4.5 McMaster sayım kamerasında belirlenen strongylid yumurtaları

Tablo 4.4 Strongylid yumurtaları ile pozitif belirlenen atlarda EPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grubu		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven aralığı	
				Alt	Üst
≤10 yaş	N	31	5	23	40
	Ortalama	750,8	249,1	323,2	1306,6
	Std. Sapma	1264,9	399,4	325,8	1807,4
	Std. Hata	258,2			
	Minimum	20			
	Maksimum	4700			
11-15 yaş	N	43	5	34	53
	Ortalama	663,9	291,9	170,5	1290,0
	Std. Sapma	1707,8	577,1	308,6	2468,0
	Std. Hata	306,7			
	Minimum	20			
	Maksimum	6880			
≥16 yaş	N	24	4	15	33
	Ortalama	360,2	74,4	232,0	523,2
	Std. Sapma	474,7	98,7	256,0	639,7
	Std. Hata	72,4			
	Minimum	20			
	Maksimum	2020			
Toplam	N	98	0	98	98
	Ortalama	551,9	116,1	342,2	786,7
	Std. Sapma	1187,1	264,3	601,1	1612,3
	Std. Hata	117,8			
	Minimum	20			
	Maksimum	6880			

^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır



Şekil 4.6 EPG değerlerinin atların yaş gruplarına göre dağılım grafiği

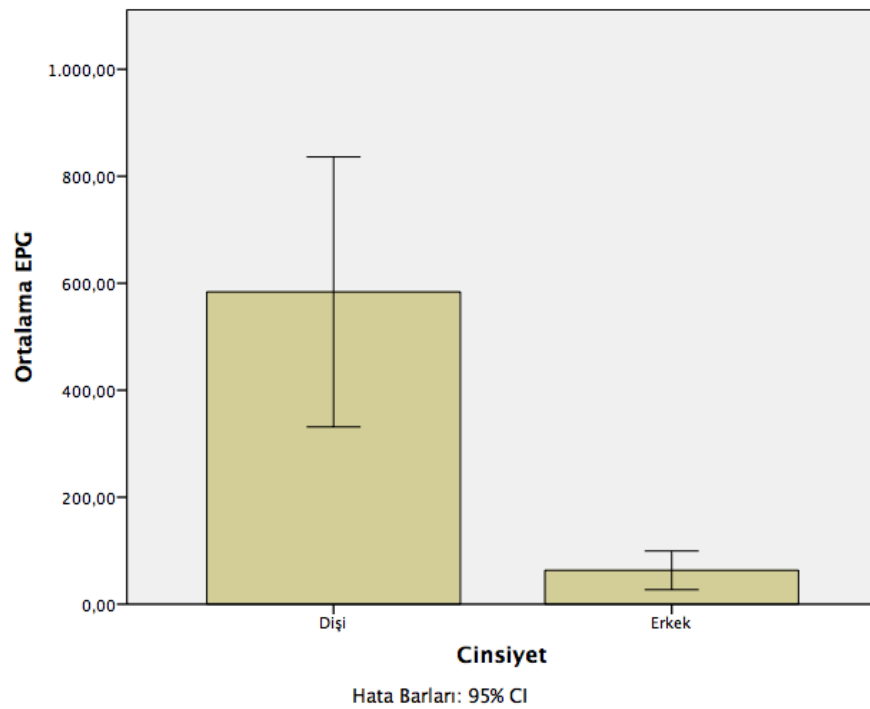
Tablo 4.5 Atlarda EPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımının istatistiksel analizi

	(I) Yaş	(J) Yaş	Ortalama farklılık (I-J)	Std. Hata	Sig.	95% Güven aralığı	
						Alt sınır	Üst sınır
Tamhane	≤10 yaş	11-15 yaş	303,63	315,17	,715	-488,58	1095,85
		≥16 yaş	-86,96	400,95	,995	-1075,5	901,66
	11-15 yaş	≤10 yaş	-303,63	315,17	,715	-1095,8	488,58
		≥16 yaş	-390,60	268,17	,401	-1073,6	292,46
	≥16 yaş	≤10 yaş	86,96	400,95	,995	-901,66	1075,58
		11-15 yaş	390,60	268,17	,401	-292,46	1073,67
*. Ortalama farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.							

Atların cinsiyetine göre ortalama EPG değerleri dişilerde 583,8, erkeklerde ise 63,3 saptanmıştır (Tablo 4.6). EPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımında (Şekil 4.7) belirlenen farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) bulunmuştur (Tablo 4.7).

Tablo 4.6 Strongylid yumurtaları ile pozitif belirlenen atlarda EPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet		İstatistik	Bootstrap ^a		
			Std. Hata	95% Güven aralığı	
				Alt	Üst
Erkek	N	6			
	Ortalama	63,3333	,2461	14,1580	35,0000
	Std. Sapma	34,44803	-5,02258	10,52016	,00000
	Std. Hata	14,06335			
Dişi	N	92			
	Ortalama	583,8043	1,5734	123,2787	371,5343
	Std. Sapma	34,44803	-5,02258	10,52016	,00000
	Std. Hata	127,06167			

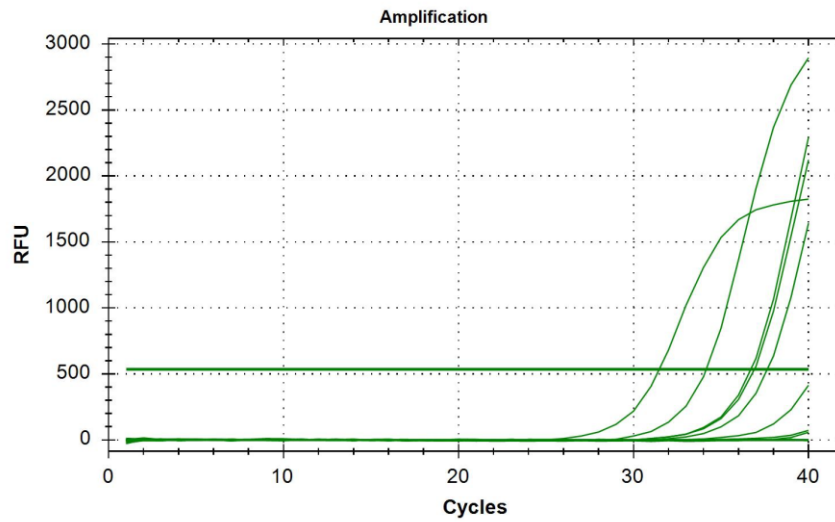
^a Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır**Şekil 4.7** EPG değerlerinin atların cinsiyetine göre dağılım grafiği**Tablo 4.7** Atlarda EPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımının istatistiksel analizi
Ortalamaların eşitliği için t-testi

	Ortalamaların eşitliği için t-testi					
	t	df	Sig. (2-uçlu)	Ortalama farklılık	Std. Hata farklılık	Farklılık için 95% Güven aralığı
						Alt Üst
EPG	4,071	92,989	,000	520,47	127,83	266,61 774,33

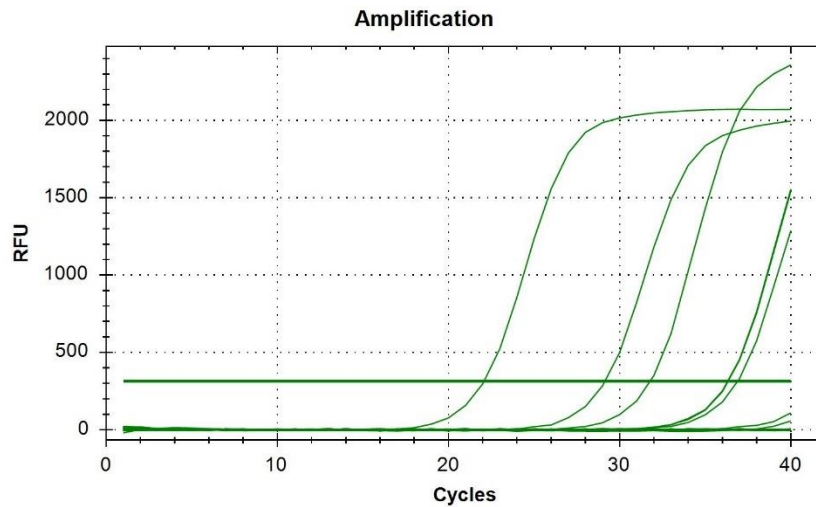
4.3 MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI

4.3.1 *S. vulgaris* Real Time PCR Analiz Sonuçları

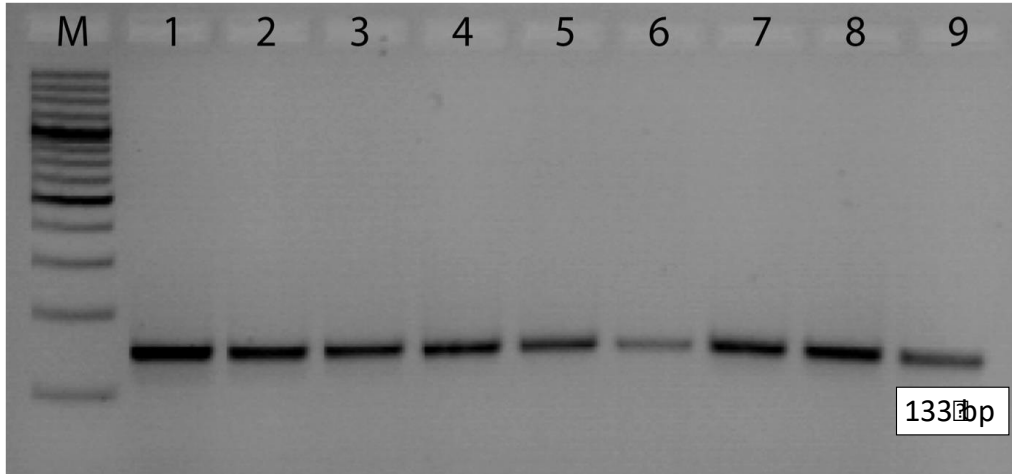
Dışkı muayenesi sonuçlarına göre Strongyle enfeksiyonu belirlenen 98 ata ait yumurta süspansiyonlarından elde edilmiş genomik DNA izolatlarının hem TaqMan prob bazlı real time PCR (Şekil 4.8) hem de bu çalışma ile geliştirilen Sybergreen Real Time PCR (Şekil 4.9) teknikleri ile yapılan analizleri sonucu 19'unun *S. vulgaris* için spesifik amplifikasyon gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda Real Time PCR analizleri sonucu elde edilen ampliconlar agaroz jel üzerinde yürütülerek hedef büyüklükte (133 bp) ampliconların varlığı teyit edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.8 TaqMan Real Time PCR'da *S. vulgaris* için belirlenen amplifikasyon eğrileri

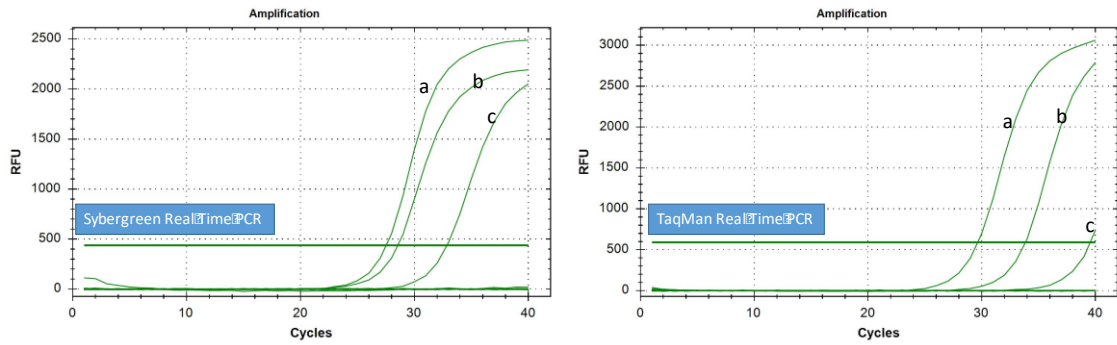


Şekil 4.9 Sybergreen Real Time PCR'da *S. vulgaris* için belirlenen amplifikasyon eğrileri



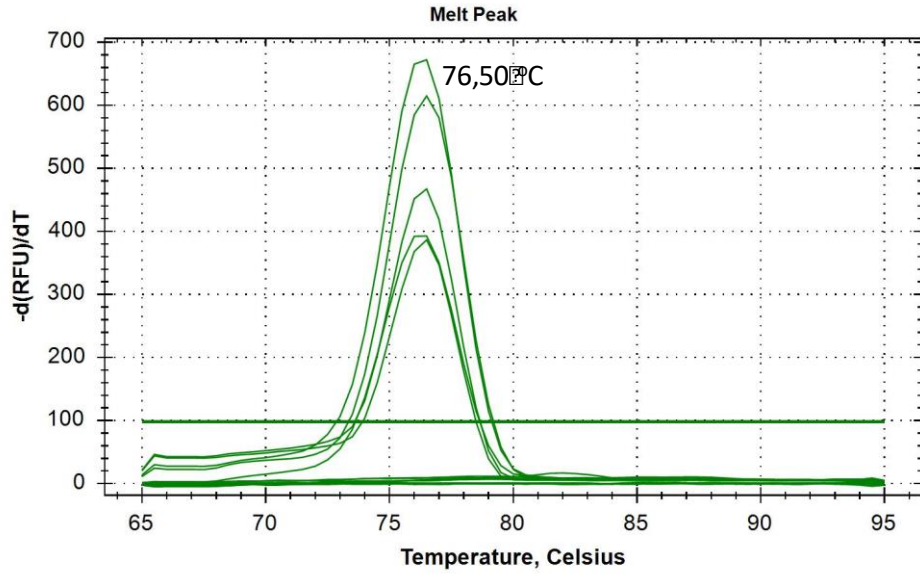
Şekil 4.10 Sybergreen Real Time PCR ürünlerinin jel elektroforezde görünümü. M: 100 bp marker; 1-9: *S. vulgaris* pozitif izolatlar

Bu sonuçlarla araştırmada *S. vulgaris*'in moleküler prevalansı %12,7 olarak belirlenmiştir. Her iki teknikte aynı izolatlar üzerinde elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde geliştirilmiş olan sybergreen Real Time PCR metodolojisinin amplifikasyon açısından daha etkin olduğu ve her örnek için daha düşük DNA kopya sayısında eşik değer siklusunu (Cq) aştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11) ve bu farklılıkta istatistik açıdan önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur.



Şekil 4.11 Amplifikasyon etkinliği açısından Sybergreen ve TaqMan Real Time PCR'da aynı örnekler (a, b, c) için belirlenen amplifikasyon eğrileri.

Erime eğrisi (Melt curve) analizlerinde geliştirilen sybergreen Real Time PCR ile spesifik olarak *S. vulgaris* nesillerinin 76,50°C erime sıcaklığı gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Sybergreen Real Time PCR’da erime eğrisi analizlerinde *S. vulgaris* nesillerine ait izolatlar için belirlenen spesifik erime ısıları.

Geliştirilen sybergreen Real Time PCR tekniğinin sensitivite analizleri için linearize plazmidler kullanılarak oluşturulan standart eğri analiz sonucunda (Şekil 4.13) *S. vulgaris* nesilleri için $1 \times 10^1/\mu\text{l}$ DNA kopya düzeyinde testin etkin olarak amplifikasyon gösterdiği belirlenmiştir. *S. vulgaris* nesilleri için Real Time PCR sensitivite analizlerinde >0.97 saptanma katsayısıyla (coefficient of determination- R^2) slope değeri -3.56 saptanmış ve reaksiyon etkinliği (E) %91,0 olarak bulunmuştur (Şekil 4.13).



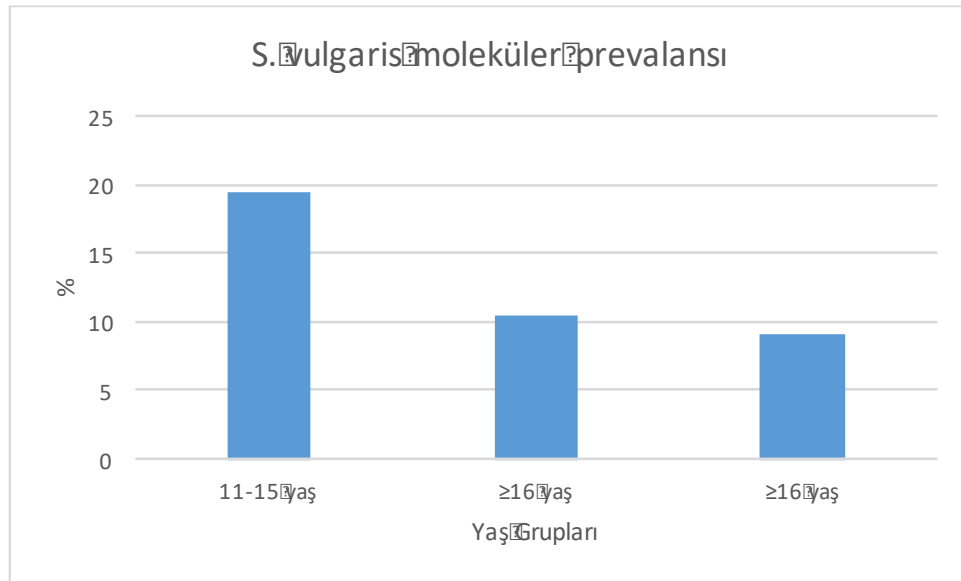
Şekil 4.13 Sybergreen Real Time PCR’da *S. vulgaris* linearize plazmid DNA izolatu ile oluşturulan standart eğri ve etkinlik oranı. 1: 1×10^8 ; 2: 1×10^7 ; 3: 1×10^6 ; 4: 1×10^5 ; 5: 1×10^4 ; 6: 1×10^3 ; 7: 1×10^2 ; 8: 1×10^1 kopya DNA/ μl

S. vulgaris yönünden Real Time PCR analizleri ile pozitif belirlenen atların yaş gruplarına göre dağılımları Tablo 4.8’de verilmiştir. *S. vulgaris* pozitifliği belirlenen tüm atların dışı olduğu tespit edilmiş erkeklerde pozitiflik saptanmamıştır.

Tablo 4.8 *S. vulgaris* yönünden Real Time PCR analizleri ile pozitif belirlenen atların yaş gruplarına göre prevalansı

Yaş Grupları	İncelenen hayvan sayısı	Pozitif hayvan sayısı	Prevalans (%)
≤10 yaş	41	8	19,5
11-15 yaş	76	8	10,5
≥16 yaş	33	3	9,1
Toplam	150	19	12,7

Tablo 4.8’de görüleceği üzere yaş gruplarına göre *S. vulgaris* moleküler prevalansı en yüksek %19,5 ile ≤10 yaş grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla %10,5 ve %9,1 ile 11-15 yaş ve ≥16 yaş grupları izlemiştir. Atların yaş gruplarına göre *S. vulgaris* moleküler prevalansı ayrıca Şekil 4.14’de verilmiştir. Yaş gruplarına göre *S. vulgaris* prevalansında istatistiksel açıdan (Tablo 4.9) önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).



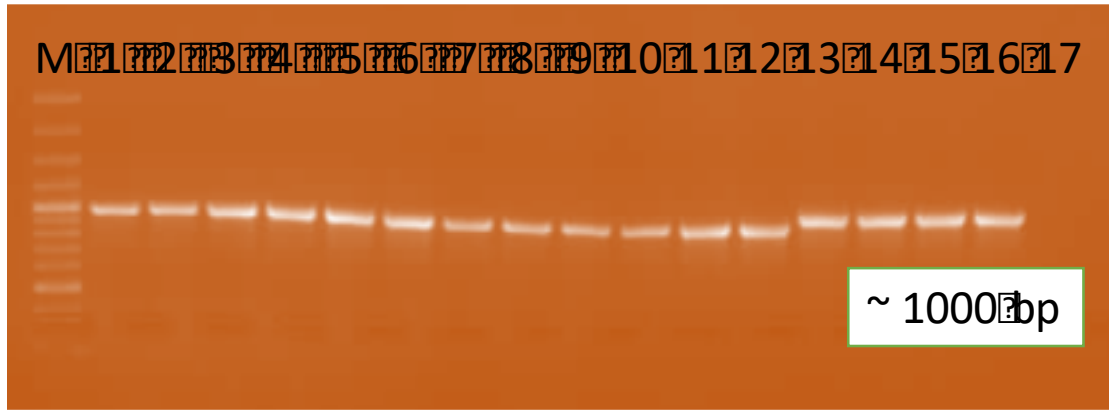
Şekil 4.14 Atların yaş gruplarına göre *S. vulgaris*’in moleküler prevalansı

Tablo 4.9 Yaş gruplarına göre *S. vulgaris* prevalansının istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

Ki-Kare Testi			
	Değer	df	Asymp. Sig. (2-yönlü)
Pearson Chi-Square	2,433	2	,296
Likelihood Oranı	2,275	2	,321
Linear-Linear İlişki	1,190	1	,164
Geçerli olgu sayısı	150		

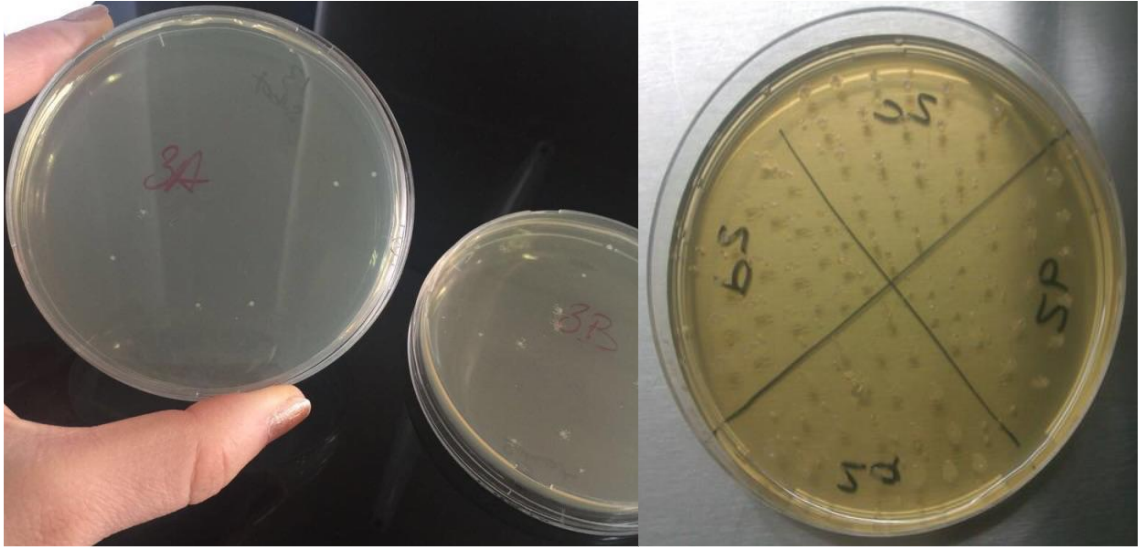
4.3.2 Ribozomal ITS-1, 5.8S, ITS-2 Gen Bölgesinin Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları

Strongyle enfeksiyonu belirlenen atların dışkı örneklerinden izole edilen yumurta süspansiyonlarına ait genomik DNA izolatlarının ribozomal ITS-1, 5.8S, ITS-2 bölgesini hedef alan primerlerle amplifikasyonu sonucu hedef büyüklükte ampliconlar belirlenmiştir. Bazı örneklerle ait ampliconlarının agaroz jel üzerinde görünüşleri Şekil 4.15’de verilmiştir.



Şekil 4.15 Strongylid yumurta süspansiyonlarından elde edilmiş genomik DNA izolatlarının ITS-1, 5.8S, ITS-2 bölgesini hedef alan primerlerle PCR’ı sonucu belirlenen ampliconların jel elektroforezde görünümü M: Marker; 1-15: Pozitif izolatlar; 16: Referans gDNA; 17: No DNA

Sybergreen Real Time PCR analizleri ile *S. vulgaris* pozitifliği belirlenen izolatlar içerisinde uygun konsantrasyonda belirlenen izolatlara ait ampliconlar jel pürifiye edilerek uygun plazmid vektörlere klonlanmıştır. Klonlama sonucu katı besi yerinde üreyen kolonilerden (Şekil 4.16), her bir koloniye tek bir DNA fragmenti girmesinden dolayı, *S. vulgaris* DNA’sını içeren kolonilerin belirlenebilmesi için her bir koloni steril pipet uçları ile alınıp ayrı ayrı tekrar işaretli LB katı besi yerine ekilerek çoğaltılmaları sağlanmıştır (Şekil 4.16). Ertesi gün çoğaltılan kolonilerden seçilen tek koloniler *S. vulgaris* DNA’sının varlığı açısından geliştirilen sybergreen real Time PCR ile analizlerine tabii tutulmuş ve *S. vulgaris* DNA’sının girdiği ve girmediği koloniler belirlenmiştir. Hem *S. vulgaris* DNA’sının insert olduğu hem de *S. vulgaris* pozitifliği göstermeyen ve muhtemelen diğer strongyle türlerine ait olabilecek DNA fragmentlerini içeren 10’ar koloni işaretli bölmelerden tekrar steril özelerle alınarak sıvı besi yerine aktarılmış ve sonrasında rekombinant plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmidlerde hedef insert genlerin confirmasyonu vektör spesifik pJET1.2 forward ve pJET1.2 reverse primerleri ile prosedürüne uygun olarak PCR analizleriyle yapılmıştır.



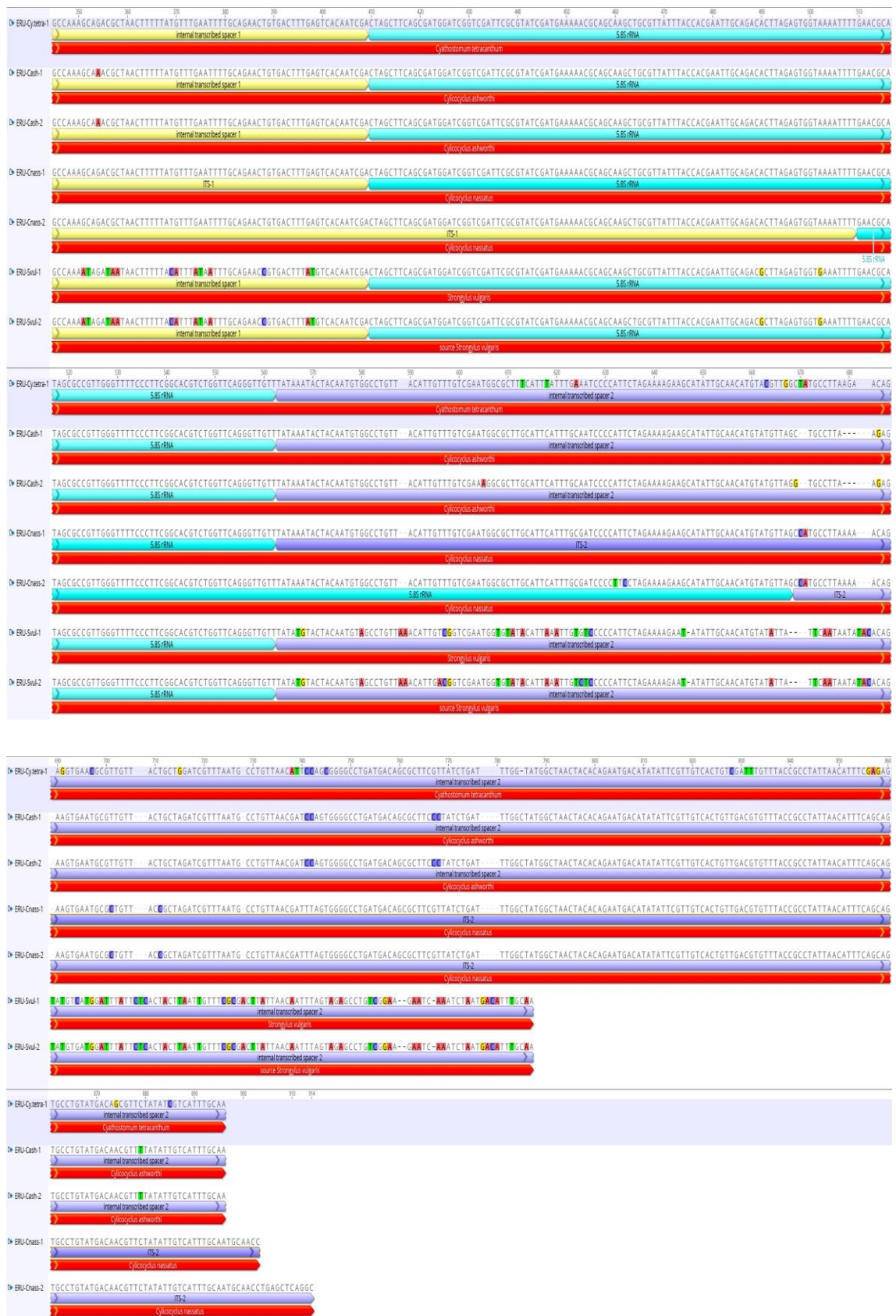
Şekil 4.16 LB katı besi yerinde üreyen koloniler

Sekans analizlerine dahil edilen 10 adet *S. vulgaris* ve 10 adet de diğer strongyle türlerine ait örneğe ait ITS-1, 5.8S, ITS-2 bölgesini içeren plazmid DNA izolatlarının elde edilen nükleotid sekans kromotogramları dikkatlice analiz edilmiş ve forward ve reverse dizilimlerin ikili hizalamaları ile hedef gen bölgesi dizilimleri plazmid DNA'sı içerisinde izole edilerek karakterize edilmiştir. Elde edilen sekansların haplotip analizleri sonucu *S. vulgaris* içerisinde iki haplotip belirlenmiş ve sekanslanan izolatların haplotiplere göre dağılımı GenBank aksesyon numaraları ile birlikte Tablo 4.10'da verilmiştir. Diğer strongyle türlerine ait sekansların blastn analizleri sonucu *Cylicocyclus nassatus*, *C. ashworthi* ve *Cyathostomum tetracanthum* olmak üzere üç tür tanımlanmıştır. *C. nassatus* ve *C. ashworthi* türleri için ikişer, *Cy. tetracanthum* türü için de bir haplotipin varlığı tespit edilmiştir. İlgili türlere ait izolatların haplotiplere göre dağılımı GenBank aksesyon numaraları ile birlikte yine Tablo 4.10'da gösterilmiştir. Sekans analizleriyle belirlenen haplotiplerin nükleotid dizilimleri çoklu hizalama analizleriyle birlikte Şekil 4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.10 Moleküler karakterizasyonları yapılan strongyle türlerinde belirlenen haplotipler

Strongyle türü	Belirlenen Haplotip		
	Adı	Haplotipe ait sekanslanan izolat sayısı	GenBank Aksesyon
<i>S. vulgaris</i>	ERU-Svul-1	7	MF489225
	ERU-Svul-2	3	MF489226
<i>C. nassatus</i>	ERU-Cnass-1	4	MF489227
	ERU- Cnass-2	1	MF489228
<i>C. ashworthi</i>	ERU- Cash-1	2	MF489229
	ERU- Cash-2	1	MF489230
<i>Cy. tetracanthum</i>	ERU-Cy.tetra-1	2	MF489231





Şekil 4.17 Çalışmada karakterize edilen *S. vulgaris* ve diğer strongyle türlerine ait izolatların ITS-1, 5.8S, ITS-2 bölgesi nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları

Çalışmada araştırma yöresinde belirlenen *S. vulgaris* ve diğer strongyle türlerine ait ribozomal ITS-1, 5.8S, ITS-2 sekansları arasında 733 (%81,2) identik bölge belirlenirken 7 farklı haplotipi (Tablo 4.10) ortaya koyan 133 polimorfik bölge saptanmıştır. Sekanslanan izolatlar arasında ortalama ikili hizalama identiklik oranı %89,7 belirlenmiş olup ikili hizalama analiz sonucu belirlenen identiklik oranları ayrıca Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.11 Moleküler karakterizasyonları yapılan strongyle türlerine ait haplotipler arasındaki ikili hizalama identiklik oranları

	ERU-Cy.te...	ERU-Cash-1	ERU-Cash-2	ERU-Cnas...	ERU-Cnas...	ERU-Svul-1	ERU-Svul-2
ERU-Cy.tetra-1		96.0%	95.5%	96.2%	96.0%	80.1%	79.8%
ERU-Cash-1	96.0%		99.5%	97.7%	97.5%	80.3%	80.0%
ERU-Cash-2	95.5%	99.5%		97.2%	97.0%	80.2%	79.9%
ERU-Cnass-1	96.2%	97.7%	97.2%		99.8%	80.8%	80.4%
ERU-Cnass-2	96.0%	97.5%	97.0%	99.8%		80.5%	80.1%
ERU-Svul-1	80.1%	80.3%	80.2%	80.8%	80.5%		99.4%
ERU-Svul-2	79.8%	80.0%	79.9%	80.4%	80.1%	99.4%	

4.3.3 Filogenetik Analiz Sonuçları

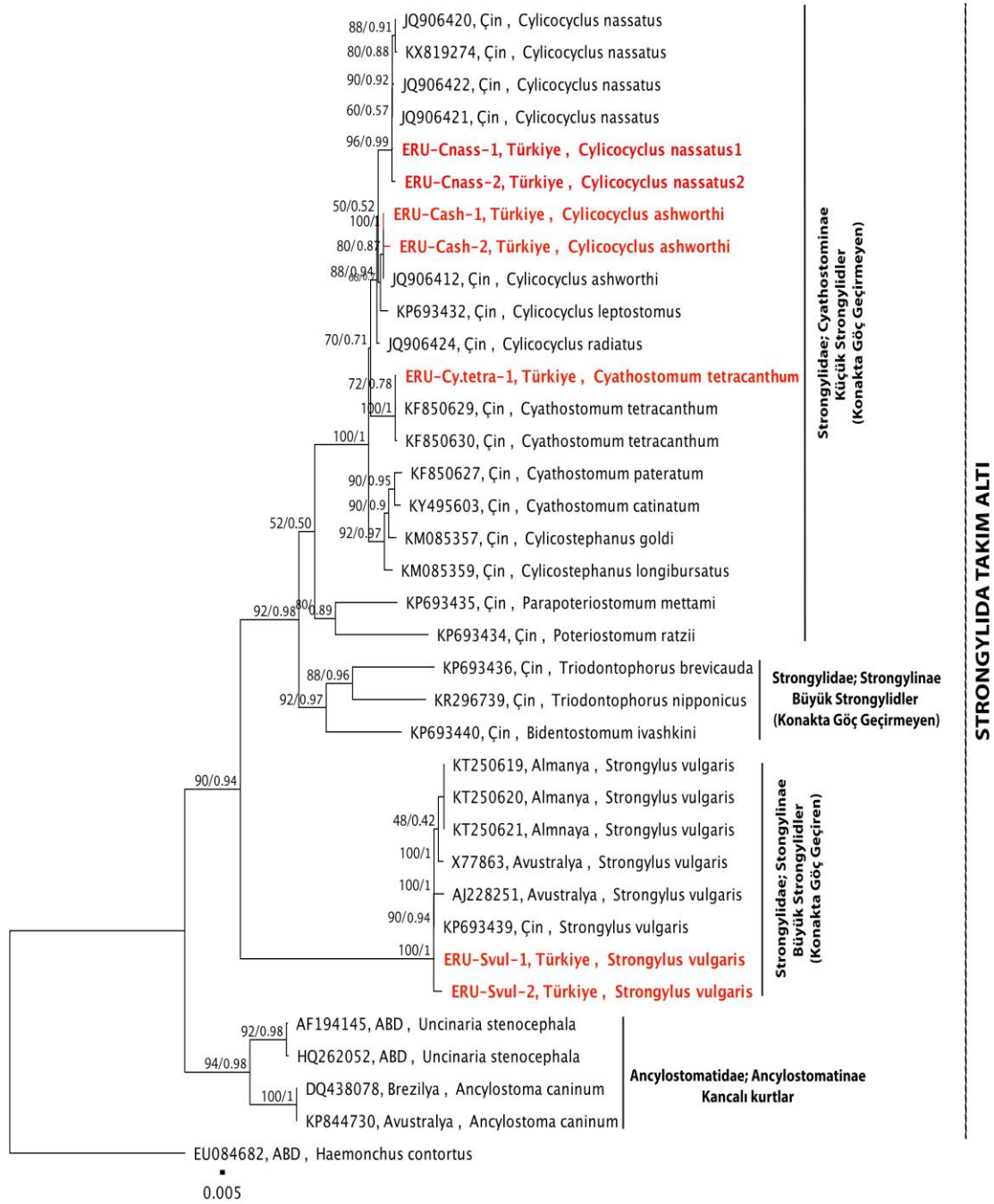
Ribozomal ITS-1, 5.8S, ITS-2 gen bölgesi filogenetik analizlerine çoklu hizalama analiz sonuçları temelinde çalışmada elde edilen izolatlarla birlikte GenBank’ta mevcut olan Strongylida takım altında yer alan türlere ait çeşitli ülkelerden toplam 28 izolat dahil edilmiş, monofiletik dış grup olarak *Haemonchus contortus* (GenBank aksesyon: EU084682) kullanılmıştır (Şekil 4.18). Bayesian inference (BI) ve Maximum Likelihood (ML) filogenisine göre oluşturulan filogenetik ağaçlar aynı topolojiyi göstermiş ve posterior olasılıklar ile bootstrap oranları tek bir ağaç (Şekil 4.18) üzerinde gösterilmiştir. Çalışmada karakterize edilen türlere ait haplotipler ile filogenetik kıyaslamaya dahil edilen türlere ait haplotiplerin ITS-1, 5.8S, ITS-2 gen bölgesi nükleotid sekansları arasında ortalama genetik heterojenite $31,8 \pm 6,2$ saptanmıştır. Çalışmada Strongylinae aile altında büyük strongyle türlerinden *S. vulgaris*’e ait ERU-Svul-1 ve ERU-Svul-2 haplotipleri arasında $0,6 \pm 0,3$ genetik farklılık belirlenmiştir. Bu haplotipler en yüksek identikliği ortalama %99,7 ile Çin’den rapor edilmiş *S. vulgaris* izolatı ile göstermiş Almanya ve Avustralya izolatları ile de %98,2 identik bulunmuşlardır. Filogenetik ağaç (Şekil 4.18) üzerinde görüleceği üzere *S. vulgaris* haplotiplerinin monofiletik küme oluşturdukları görülmüş ve bu filogenetik yapılanma yüksek bootstrap (%100) ve posterior olasılıkla (1.00) desteklenmiştir. Ayrıca *S. vulgaris* haplotiplerinin analiz edilen

diğer tüm strongylid türlerden genetik olarak daha uzak olduğu, dış gruba yerleştiği ve kancalı kurt türlerine genetik olarak daha yakın oldukları (ortalama %71,7 identiklik) tespit edilmiştir.

Çalışmada karakterize edilen Cyathostominae aile altındaki küçük strongyle türlerinden *C. nassatus*'a ait ERU-Cnass-1 ve ERU-Cnass-2 haplotiplerinin $0,2 \pm 0,2$ genetik farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. İlgili haplotipler Çin'den rapor edilmiş *C. nassatus* izolatları ile ortalama %99,6 identiklik göstererek tür bazlı monofiletik grup oluşturmuşlardır. *C. nassatus*'un monofiletik yapılanması da yüksek bootstrap (%96) ve posterior olasılıkla (0.99) desteklenmiştir (Şekil 4.18). *C. nassatus* filogenetik olarak en yüksek identikliği %98,7 ile yine Cyathostominae aile altındaki *C. radiatus* türüne göstermiş ayrıca *C. ashforti* türü ile de yakın ilişkili (% %97,5) bulunmuştur.

Araştırmada Cyathostominae aile altındaki küçük strongyle türlerinden *C. ashworthi* ERU- Cash-1 ve ERU- Cash-2 haplotipleri arasında $0,5 \pm 0,3$ genetik farklılık tespit edilmiştir. Bu haplotipler Çin'den rapor edilmiş *C. ashworthi* izolatu ile ortalama %99,8 identiklik göstererek tür bazlı monofiletik grup oluşturmuşlardır (Şekil 4.18). *C. ashworthi* monofiletik yapılanmasının yüksek bootstrap (%88) ve posterior olasılıkla (0.94) desteklendiği görülmüştür (Şekil 4.21). *C. ashworthi* filogenetik olarak en yüksek identikliği %98,6 ve %98,5 ile yine Cyathostominae aile altındaki sırasıyla *C. leptostomus* ve *C. radiatus* türlerine göstermiştir.

Cyathostominae aile altındaki küçük strongyle türlerinden *Cy. tetracanthum*'a ait ERU-Cy.tetra-1 haplotipinin Çin'den rapor edilmiş *Cy. tetracanthum* izolatları ile ortalama %99,9 identik olduğu ve tür bazlı monofiletik grup oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 4.18). *Cy. tetracanthum* monofiletik yapılanması da yüksek bootstrap (%100) ve posterior olasılıkla (1.00) desteklenmiştir (Şekil 4.18). *Cy. tetracanthum* filogenetik olarak en yüksek identikliği %96,4 ile Cyathostominae aile altındaki *C. radiatus* türü ile göstermiştir.



Şekil 4.18 *Strongyle* izolatlarının ITS-1, 5.8S, ITS-2 gen bölgesi BI ve ML analizlerine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen izolatlar kırmızı ve kalın karakterde gösterilmiştir. Node'ların önündeki rakamlar ML bootstrap ve BI posterior olasılığını göstermektedir. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Strongylidae ailesindeki nematod parazitlerin atlarda yaygın olarak görüldüğü dünyanın çeşitli ülkelerinde koproskopik ve postmortem muayenelerle yürütülen çalışmalarla ortaya konmuştur (58, 154-160). Geleneksel olarak Strongylidae ailesi Strongylinae (5 soy: *Strongylus*, *Triodontophorus*, *Bidentostomum*, *Craterostomum* ve *Oesophagodontus* içerisinde 15 tür; büyük strongyle türleri olarak gruplanırlar) ve Cyathostominae (*Cyathostomum*, *Coronocyclus*, *Cylicodontophorus*, *Cylicocyclus*, *Cylicostephanus*, *Poteriostomum*, *Gyalocephalus*'u da içeren 14 soy içerisinde 52 tür; küçük strongyle türleri olarak gruplanırlar) (17) aile altlarına ayrılmaktadır. Bu aile altlarında yer alan türler morfolojik olarak farklı olup gelişim dönemleri, lokalizasyon, beslenme tarzı ve ergin ve larvaların patojenitesi ve ilaçlara dirençlilik gibi çeşitli faktörler yönünden de farklılık gösterirler (22). Atların parazitleri üzerine çok sayıda bildirim bulunmasına karşın özellikle patojenik yapı sergileyen Strongylinae aile altındaki büyük strongyle soylarından *Strongylus* soyu üzerine detaylı araştırmaların (12, 22, 67, 161-163) daha sınırlı olduğu görülmektedir. *Strongylus* soyu içerisinde yer alan türlerin hem erginleri hem de larvaları patojenik etki gösterir (1, 164) ve konak organizmada göç geçirirler. *S. vulgaris*, oluşturduğu patojenite açısından geçmişten günümüze atların en patojen mide-bağırsak paraziti olarak nitelenmiştir (1, 7, 8, 12). *S. vulgaris* larvaları dolaşım sisteminde göç geçirir ve bu larvalar damar duvarında yapışmalara, aneurizmaya ve küçük arterlerde embolilere yol açarlar. *S. edentatus* larvaları da parietal periton altından göç geçirerek periton yangısına ve göçü sırasında karaciğerde hasara yol açar. Benzer şekilde *S. equinus* larvaları da karaciğerde hasara ve sonrasında pankreasta yangıya yol açabilir. Bu soya bağlı nematodların erginleri ise fırsatçı olarak kalın bağırsakta müköz membranları geniş ağız kapsülleri içine alarak sindirmesi sonucu lezyonlara yol açarlar. Ayrıca bu nematodlar ağız kapsüllerindeki kesici komponentlerle müköz membranlarda insizyonlara yol açarak kan emebilirler ve özellikle çok sayıda larva olduğu durumlarda anemi ortaya çıkar (22). Geçmiş zamanda modern anthelmintik ilaçların henüz

geliştirilmediği dönemde endemik bölgelerde *S. vulgaris*'in %80'in üzerinde prevalans gösterdiği ve dolayısıyla parazit kontrolünde primer hedef haline geldiği kaydedilmiştir (16). Takip eden süreç içerisinde anthelmintik tedavisinin yoğun bir şekilde kullanımı özellikle at yetiştiriciliği yapılan çiftliklerde *S. vulgaris* prevalansının belirgin şekilde düşmesine ve günümüzde bu tip çiftliklerde parazitin seyrek olarak yol görülmesine yol açmıştır (165-167). Ancak bunun yanında ilaçlamanın sık olarak yapılmadığı bölgelerde, *S. vulgaris*'in halen yüksek yaygınlık gösterdiği de kaydedilmektedir (157, 168). Son 50 yıl içerisinde birçok ülkede atların profilaktik amaçla yılda birden fazla ilaçlandığı görülmektedir (6, 169-172). Bu yaklaşımın daha çok *S. vulgaris* enfeksiyonlarından kaçınmak için uygulandığı belirtilmektedir (12). Bu tip yoğun anthelmintik kullanımı Cyatostomine aile altındaki küçük strongyle türlerinde özellikle benzimidazol ve pyrantel grubu ve son yıllarda da macrocyclic lactonlara karşı olmak üzere yaygın bir dirençliliğin oluşmasına yol açmış (173, 174) ve dolayısıyla Cyatostomine aile altındaki bu nematodların atlarda patojenite açısından *S. vulgaris* ile yer değiştirdiği kaydedilmiştir (15, 173). Bu değişim de daha fazla anthelmintik dirençliliği gelişimini geciktirmek amacıyla ilaç kullanım yoğunluğunu azaltmak için survelians tabanlı parazit kontrol programlarının ön plana çıkmasına yol açmıştır (15, 45). Birçok Avrupa ülkesinde profilaktik tedaviden ziyade teşhise dayalı tedavi ve parazit surveliansı uygulamaya geçirilmiş ve selektif terapi temelinde strongyle kontrol programları şekillendirilmiştir (161, 175). Bu tip uygulamada dışkı yumurta sayısı önceden belirlenen cutoff değerinin üstüne çıkan atlar tedaviye alınırken, bu değerinin altında kalanlara ilaç uygulaması yapılmamaktadır (106, 109). Yine bu uygulamada başta *S. vulgaris* olmak üzere daha patojenik olan büyük strongyle türlerinin varlığının belirlenmesi ve takibinin yapılması ihtiyacı ortaya çıkmıştır (161).

Nevşehir yöresindeki çeşitli çiftliklerde bulunan atlar üzerine yürütülen bu çalışma Türkiye'de strongyle türleri üzerine moleküler epidemiyolojik tabanlı ilk verileri ortaya koymuştur. Çalışmada diğer birçok ülkede yürütülen araştırmaların (31, 46-48, 50, 155, 168, 176, 177) sonuçlarına paralel olarak dışkı muayene sonuçlarına göre atlarda strongyle nematodların oldukça yaygın olduğu (%65,3) belirlenmiştir. Türkiye'de strongyle enfeksiyonları üzerine çalışmaların daha çok konvansiyonel dışkı muayenesi ve nekropsi verilerine dayalı prevalans çalışmaları (53-66, 178-181) olduğu görülmektedir. Çeşitli illerde yapılan araştırmalarda tektırnaklıların paraziter enfeksiyon oranlarının

%16,2 ile %100 arasında değiştiği rapor edilmiştir (53-57). Tüm bu araştırmalar (54-66) Türkiye'de de tek tırnaklılarda en çok yayılış gösteren helminlerin Strongylidae ailesine ait olduklarını göstermiştir. Türkiye'nin farklı bölgelerinde yapılan ilgili araştırmalar (54-66) atlarda Strongylidae spp. enfeksiyon oranlarının %63,04-%100,0 arasında olduğunu rapor etmiştir. Yukarıda yapılan çalışmalar sonucunda Türkiye'de atlarda *S. vulgaris*'in larva kültürü ve nekropsi sonuçlarına göre %2,9-35,3 arasında değiştiği görülmektedir. Bu alışmada Nevşehir yöresinde incelenen atlarda Strongyle enfeksiyonlarının dışkı muayenesi sonuçlarına göre %65,3 oranında prevalans gösterdiği belirlenmiş ve bu oranın da Türkiye'de günümüze kadar bildirilen prevalans limitleri arasında olduğu grlmştir. Ayrıca çalışmada kullanılan TaqMan real time PCR ve yeni geliştirilen sybergreen real time PCR analizleri ile *S. vulgaris*'in %12,7 prevalansa sahip olduğu grlmştir. Araştırmada Strongyle enfeksiyonlarının %65'in üzerinde yaygın bulunması buna karşın *S. vulgaris* prevalansının ise daha sınırlı kalması çeşitli araştırmacıların (165-167, 173, 174) belirttiği gibi Cyatostomine aile altındaki küçük strongyle türlerinde gelişen direnlilikle ilişkili olabileceği dşnlmştir. Nitekim araştırmamızda sekans analizi sonucu belirlenen Cyatostomine aile altına ait türlerin dünyada atlarda en yaygın olduğu bildirilen (31, 44, 46-48, 168, 176, 182) 10-12 tür içerisinde yer aldığı görülmüş ayrıca bu türlerin benzimidazol grubu anthelmintiklere direnç geliştirdiği de rapor edilmiştir (5, 133, 183). Nitekim rneklemeye çiftliklerinde bakıcılar ile yapılan görüşmelerde benzimidazol grubu anthelmintiklerin atlarda rutin olarak profilaktik amaçla kullanıldığı anlaşılmıştır.

Atlarda strongyle parazitlerin biyoçeşitliliği ve yapısı üzerine i ve dış faktörlerin önemli rolü olduğu kaydedilmiştir (67). Çeşitli ülkelerde yapılan araştırmaların (44, 46-50, 168, 176, 184-186) sonuçları 20 veya daha fazla strongyle türünün eş zamanlı olarak bir atta parazitlenebileceğini göstermiştir. Farklı türlerin oranının ve strongyle topluluklarının yapısının farklı yaş grubu atlarda, bölge ve at iftliği tiplerinde değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (34, 67, 133, 187, 188). Çalışmamızda incelenen atlar sabit padok veya sabit mera yetiştiricilik sistemleri içerisinde bulunmakta olup daimi meralarda veya padoklarda otlatıldıkları grlmştir. Bu durumun da anthelmintiklerin düzensiz kullanımının yanısıra ilgili çiftliklerde strongyle enfeksiyonların yayılışına pozitif yönlü etki gösterdiği dşnlmştir. Birçok araştırmacı (34, 49, 189-191) strongyle enfeksiyonlarını ve EPG düzeylerini ergin atlara oranla genç atlar ve taylarda daha yüksek belirlemişler ve bu

durumun bağışıklık düzeyi ile ilişkili olabileceği gibi daha çok atların ırkı ve at yetiştiriciliği şekli (primer olarak, anthelmintik kullanım sıklığı) gibi daha önemli faktörlere bağlı olabileceğine dikkat çekmişlerdir. Diğer yandan bazı çalışmada (84, 192-194) atların yaşı ve EPG düzeyleri arasındaki korelasyon dökümanite edilmemiş, diğer bazılarında (191, 195, 196) ise ergin evcil atlarda, bir yaşındaki atlar ile taylara oranla EPG değerlerinde artış kaydedilmiştir. Çalışmamızda yaş gruplarına göre strongyle enfeksiyonlarının analizi noktasında 10 yaş ve altı, 11-15 yaş ve 16 yaş ve üstü olmak üzere yaş grupları oluşturulmuştur. Çalışmada 2 yaş ve altı at sayısının iki ile sınırlı olması ve bu grup atların çoğunun 8-10 yaş arasında olması ile ilgili grup ≤ 10 yaş grubu olarak kategorize edilmiş ve diğer yaş grupları da buna göre oluşturulmuştur. Analiz strongyle enfeksiyonları en yüksek ≤ 10 yaş grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla ≥ 16 yaş ve 11-15 yaş grupları izlemiştir. EPG değerlerinin ise en yüksek yine ≤ 10 yaş grubunda olduğu bunu 11-15 yaş ve ≥ 16 yaş gruplarının izlediği görülmüştür. Hem strongyle enfeksiyonlarının prevalansı hem de EPG değerlerinin atların yaş gruplarına göre istatistiksel açıdan önemli bir farklılık göstermediği dikkati çekmiştir. Nitekim Relf ve ark. (2013) ve Kuzmina ve ark.'nın (2016) çalışmalarında da belirttiği gibi yaş gruplarında görülen bu farklılıkların incelemeye alınan atların yaşlarından ziyade çiftliklerin anthelmintik kullanımlarının sıklığı ve düzensizliği gibi çeşitli yetiştiricilik uygulamaları ile ilgili olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda incelenen erkek at sayısı düşük olmakla birlikte enfeksiyonun dişi ve erkek atlarda benzer oranlarda seyrettiği görülmüştür. Buna karşın ortalama EPG değerleri dişilerde erkeklere oranla yaklaşık 10 kat yüksek belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Benzer şekilde çeşitli araştırmalarda (189, 190, 197) EPG değerlerinin dişi atlarda erkeklere oranla anlamlı düzeyde yüksek olduğu bildirilmiş ve bu farklılığın daha çok parazit naklini kolaylaştıran bir faktör olarak, kısırakların taylarla, yeni süttten kesilmişlerle ve genç atlarla birlikte grup olarak merada otlatılmasına, aygırların ise daha çok ahır veya padoklarda bireysel olarak tutulmalarına ve dolayısıyla parazit naklinde daha sınırlı kalmalarına bağlanmıştır (189, 190, 198). Nitekim ilgili durum örnekleme yaptığımız at çiftliklerinde de dikkati çekmiştir.

Safkan at ırklarının (Ukrayna Yarış Atı ve Rus Yarış Atı gibi) daha sık anthelmintik tedavisi almalarına karşın safkan olmayan ve yerli at ırklarına oranla daha yüksek strongyle yumurtası çıkardığı kaydedilmiş ve bu durum safkan olmayan ve yerli atlarda

bu parazitlere karşı daha yüksek bağışıklıkla ilişkilendirilmiştir (49, 67, 190, 199, 200). Araştırmamızda incelenen atların tamamının Arap atı olması sebebiyle ırka bağlı analizlerin yapılabilmesi mümkün olmamıştır. Ancak incelenen atların çoğunun safkan olması ve bu atlarda yüksek enfeksiyon oranlarının belirlenmesi yukarıdaki görüşü destekler niteliktedir. Bununla birlikte atların bu paraziter enfeksiyonlara predispozisyonlarının genetik mekanizmaları üzerine ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu da kaydedilmiştir (67, 201).

Büyük strongyle türlerinden olan *S. vulgaris*, oldukça patojenik olup enfekte atlarda ağır hastalık tablosuna yol açar. Geçmişte bu parazit atların öncelikli parazit patojeni olarak bilinmesine karşın uzun yıllar uygulanan yoğun anthelmintik kullanımı bu parazitin prevalansını önemli ölçüde düşürdüğü rapor edilmiştir (2, 108, 135, 202). Oldukça yüksek patojenik potansiyeli ve larval dönemlerin en yüksek patojenik etkiyi göstermesi, bu parazitin saptandığı çiftliklerde periyodik profilaktik tedavileri içeren parazit kontrol stratejisinin değiştirilmesine yol açmıştır. Böylece yukarıda da bahsedildiği üzere dışkı yumurta sayısı temelinde selektif tedavi stratejisi strongyle türlerin ayırımına imkân tanımadığı için bu durum *S. vulgaris*'in surveliansı için ihtiyaç doğurmuştur (14). Yakın zamana kadar *S. vulgaris*in saptanması ve identifikasyonu için tek teşhis yönteminin larva kültürü yapılması ve takiben saptanan L3 dönemlerinin morfolojik kriterlere göre mikroskopik identifikasyona dayandığı görülmektedir (9, 13). *S. vulgaris* L3'lerinin mikroskop altında teşhisi mümkün olmasına karşın, bu teşhis yönteminin, örneklerin günler boyu kültüre edilmesini gerektirmesi ve analizlerin gerçekleştirilmesinin zaman alıcı olması ve otomatize edilememesi gibi sınırlayıcı yanları bulunmaktadır. Bunun yanında *S. vulgaris* larvaları dışkı örnekleri içinde sıklıkla çok az sayıda bulunmaktadır ve bu durum da bu larvaların ortamda mevcut olan yüzlerce cyathostomin larvası arasında gözden kaçırılmasına yol açabilmektedir. Ayrıca bu teşhis yöntemi larvaların morfolojik karakterlerinin kompleks yapı sergilemesi ile uzman araştırmacılara ihtiyaç göstermektedir (13, 14). PCR tabanlı moleküler teknikler veteriner parazitoloji alanında yaygın olarak kullanım alanı bulmuştur (10, 86, 89, 203). Bu moleküler araçlar yüksek özgünlükte diagnostik yöntemlerin gelişmesine yol açmış ve böylece özellikle nadir veya sporadik olan organizmaların identifikasyonlarında kullanışlı olmuştur. Ribozomal RNA gen bölgesi göstermiş olduğu düşük intra-spesifik varyasyon ve genom içerisinde çok sayıda bulunmasıyla moleküler diagnostik testlerin geliştirilmesinde sıklıkla hedeflenen gen

bölgelerinden birisi olmuştur (14). Bu gen bölgesi bazı at strongyle parazitlerinin PCR-tabanlı olarak tür spesifik teşhisinde de kullanılmıştır (88, 90, 204). Son yıllarda floresan tabanlı real time PCR teknolojisinin spesifik patojenlerin hem kalitatif olarak saptanması hem de kantitatif ölçümüne imkan vermesiyle özgünlüğü yüksek bir yöntem olarak kullanılmaya başlandığı görülmektedir. Bu yöntem ile PCR ürünleri her siklуста reaksiyon devam ederken ölçülebilmekte ve amplifiye DNA'nın jel elektroforezde görüntülenmesine ihtiyaç göstermemektedir. Ayrıca yine bu teknoloji ile çok sayıda patojene ait hedef DNA fragmentleri eş zamanlı olarak analiz edilebilmektedir (12). Nielsen ve ark. (14), *S. vulgaris*'in spesifik kantitatif identifikasyonu için ribozomal ITS-2 gen bölgesini hedef alan TaqMan prob bazlı real time PCR metodolojisi geliştirmişler ve bu yöntemin larval kültür yöntemine göre çok daha avantajlı ve duyarlı olduğunu kaydetmişlerdir. Daha sonra yürütülen çalışmalarda (12, 13) bazı modifikasyonlarla bu yöntemin saha şartlarında kullanılabilirliği larval kültür yöntemi ile kıyaslanarak değerlendirilmiş, patent enfeksiyonların saptanma oranının larval kültür yöntemine oranla önemli derecede yüksek olduğunun altı çizilerek geliştirilen bu tekniğin referans identifikasyon tekniği olarak parazit kontrol ve surveilans çalışmalarında kullanılabileceği rapor edilmiştir. Bununla birlikte Nielsen ve ark. (13) bireysel larva sayıları ile real time PCR'da belirlenen Ct değerleri arasında linear bir ilişki olmadığını fakat qPCR sonuçlarının daha geniş çerçevede yarı-kantitatif olarak değerlendirilebileceğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar (13) Ct değeri 30'un altında belirlenen atların Ct değerinin bu düzey üzerinde (örn Ct: 31-35) belirlenenlere oranla daha yüksek düzeyde *S. vulgaris* enfeksiyonu taşıdığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda ilgili araştırmacılar (12-14) tarafından bildirilen referans real time PCR tekniği strongyle yumurtaları ile pozitif belirlenen atlarda *S. vulgaris*'in identifikasyonu için kullanılmış ve sekans analiz sonuçları temelinde ilgili tekniğin yüksek özgünlük ve duyarlılıkta olduğu görülmüştür. Çalışmamızda ayrıca *S. vulgaris* spesifik identifikasyonu için yine ribozomal ITS-2 gen bölgesini hedef alan yeni olarak dizayn ettiğimiz primerlerle sybergreen tabanlı Real Time PCR metodolojisi geliştirilmiş ve etkinliği değerlendirilmiştir. Bilindiği üzere sybergreen Real Time PCR PCR'ın her bir siklusu boyunca amplifikasyon ürünlerinin saptanması ve kantitasyonu için DNA'ya bağlanan floresan boyayı kullanmaktadır (205). Floresan problemlerin kullanıldığı yöntemlerle kıyaslandığında sybergreen real time PCR tekniğinin daha kolay uygulanabilir ve maliyet açısından daha uygun olması gibi avantajları bulunmaktadır. Ayrıca bu yöntem probe gerektirmemesiyle probun bağlandığı

hedef gen bölgesinde görülebilen nükleotid varyasyonlarından da etkilenmemekte ve bu durum da yanlış pozitifliklerin azalmasına yol açmaktadır (206). Ayrıca ribozomal ITS bölgeleri gibi intraspesifik nükleotid varyasyonları düşük interspesifik varyasyonların ise yüksek olduğu gen bölgelerini hedef alan sybergreen real time PCR yöntemleri ile erime eğrisi analizleri sonucu belirlenen spesifik erime sıcaklıkları da identifikasyonları konfirme etmekte ve eş zamanlı olarak hedef paraziter DNA'larının identifikasyonuna imkan vermektedir. Çalışmamızda geliştirilen sybergreen real time PCR tekniğinin referans TaqMan prob bazlı real Time PCR tekniği ile identifikasyon açısından benzer sonuçları verdiği görülmüş ancak amplifikasyon etkinliğinin Ct değerleri temelinde sybergreen real time PCR tekniğinde daha yüksek olduğu aynı örnekler üzerinde gerçekleştirilen analiz sonuçları ile ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca sybergreen real time PCR ile pozitif saptanan örnekler ait rRNA gen bölgesi amplikonlarının klonlanması ve sonrasında katı besiyerinde üreyen kolonilerin tekrar *S. vulgaris* yönünden sybergreen real time PCR ile koloni taramalarının yapıp pozitif kolonilerden elde edilen plazmidlerin sekans analizleri ile tamamının *S. vulgaris*'e ait olduklarının belirlenmesi ilgili tekniğin özgünlüğünün yüksek olduğunu göstermiştir. Nitekim aynı örneğe ait rRNA amplikonlarının klonlanması ve real time PCR analizleri sonucu *S. vulgaris* yönünden amplifikasyon göstermeyen kolonilere ait plazmid DNA'ların sekans analizleri sonucu diğer strongyle türlerin belirlenmesi de testin özgün olarak çalıştığını ortaya koymuştur. Çalışmamızda erime eğrisi (Melt curve) analizlerinde geliştirilen sybergreen Real Time PCR ile *S. vulgaris* nesillerinin spesifik olarak 76,50°C erime sıcaklığı gösterdikleri belirlenmiştir ve standart eğri analizleri ile de tekniğin etkinliği %91,0 olarak bulunmuştur. İlgili teknik ile 1×10^1 kopya DNA/ μ l düzeyinde *S. vulgaris* DNA'sının saptanabileceği belirlenmiştir. Tüm bu analiz sonuçları geliştirilen sybergreen real Time PCR tekniğinin avantajları da göz önüne alındığında alternatif olarak *S. vulgaris* üzerine epidemiyolojik ve surveiliens çalışmalarında kullanılabileceği düşünülmüştür.

Nükleik asit sekansları parazitlerin sistematiklerinin çalışılmasında geniş veri setlerinin elde edilmesi için alternatif bir yaklaşım oluşturmuştur (207, 208). Örneğin SSU rRNA sekansları digenean (209) ve ascaridoid parazitlerin (210) filogenetik ilişkilerinin çözümlenmesinde efektif olarak kullanılmıştır. Yine ribozomal ITS-2 gen bölgesi syrongyloid nematodların filogenilerinin ortaya çıkarılmasında kullanışlı olduğu

bildirilmesine (211) karşın at strongylid nematodları üzerine filogenetik araştırmaların (20, 212-215) sınırlı olduğu gözükmemektedir. Hung ve ark. (20) ribozomal ITS-1 ve ITS-2 gen bölgelerinin özellikle at strongyle türleri olmak üzere strongylid nematodların tür spesifik identifikasyonunda kullanılabilir olmalarıyla bu gen bölgelerinin at strongylidlerinin sistematiklerinin yeniden oluşturulmasında yeterli bilgiyi içerebileceklerini kaydetmişlerdir. Araştırmacılar at strongylid türlerinden Strongylinae ve Cyathostominae aile altlarındaki büyük ve küçük strongylid türlerinden 30 türün birleştirilmiş ITS-1 ve ITS-2 sekansları temelinde filogenetik analizlerini gerçekleştirmişler ve elde edilen moleküler verilerin geniş ağız kapsülü bulunan soyların ağız kapsülü dar olan soylara köken (achestor) oluşturduğunu hipotez etmişlerdir. Ancak araştırmacılar elde edilen verilerin Strongylinae ve Cyathostominae aile altlarının bölünmesine ve Cyathostominae alt ailesindeki morfoloji bazlı bazı taksonomik gruplamalara destek sağlamadığını kaydetmişlerdir. Çalışmamızda ITS-1, 5.8S, ITS-2 gen bölgesi sekans analizlerine tabii tutulan *S. vulgaris* izolatları arasında iki haplotipin varlığı belirlenmiş ve bu haplotipler arasında %0,6 genetik farklılık belirlenmiştir. İlgili haplotipler ayrıca en yüksek identikliği ortalama %99,7 ile Çin'den rapor edilmiş *S. vulgaris* izolatı ile göstermiş, Almanya ve Avustralya izolatları ile de %98,2 identik bulunmuşlardır. Filogenetik olarak monofiletik bir yapı sergilediği belirlenen *S. vulgaris*'in ilgili gen bölgesine göre diğer tüm strongylid türlerden genetik olarak daha uzak olduğu, dış gruba yerleştiği ve kancalı kurt türlerine genetik olarak daha yakın oldukları dikati çekmiştir. Nitekim bu sonuçların Hung ve ark.'nın (20) sonuçları ile paralel olduğu görülmüştür. Araştırmacılar (20) ayrıca ITS-1/ITS-2 gen bölgesi filogenisine göre belirgin bir küme oluşturan diğer büyük strongyle türleri *S. equinus*, *S. edentatus* ve *S. asini*'nin *S. vulgaris*'ten ziyade diğer soylara daha yakın olduğunu kaydetmişlerdir. Araştırmamızda rRNA gen bölgesi amplikonlarının klonlanması ve sonrasında katı besi yerinde üreyen kolonilerin real time PCR analizleri ile *S. vulgaris* pozitifliği göstermeyen 10 tanesi seçilerek rekombinant plazmid DNA izolasyonu yapılmış ve sekans analizleri ile belirlenen ilgili gen bölgesi DNA fragmentlerinin Cyathostominae aile altındaki küçük strongyle türlerinden *C. nassatus*, *C. ashworthi* ve *Cy. tetracanthum*'a ait oldukları belirlenmiştir. Yapılan filogenetik analizlerde her üç türe ait izolatların monofiletik yapı sergilediği görülmüştür. *C. nassatus*'a ait ERU-Cnass-1 ve ERU-Cnass-2 haplotiplerinin %0,2 genetik farklılık gösterdikleri ve Çin'den rapor edilmiş *C. nassatus* izolatları ile ortalama %99,6 identik oldukları saptanmıştır. Yine *C. nassatus*'un ilgili gen bölgesi filogenetik analizine göre

Cyathostominae aile altındaki *C. radiatus* türüne yakın olduğu görülmüştür. Filogenetik olarak en yüksek identikliği %98,7 ile yine göstermiş ayrıca *C. ashforti* türü ile de yakın ilişkili (% %97,5) bulunmuştur. Araştırmamızda karakterize edilen *C. ashworthi* ERU-Cash-1 ve ERU-Cash-2 haplotipleri arasında %0,5 genetik farklılık tespit edilmiş ve bu haplotipler Çin'den rapor edilmiş *C. ashworthi* izolatu ile ortalama %99,8 identiklik göstererek tür bazlı monofiletik grup oluşturmuşlardır. *C. ashworthi*'nin filogenetik olarak en yüksek identikliği yine Cyathostominae aile altındaki sırasıyla *C. leptostomus* ve *C. radiatus* türleriyle gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda *Cy. tetracanthum*'a ait ERU-Cy.tetra-1 haplotipinin Çin'den rapor edilmiş *Cy. tetracanthum* izolatları ile ortalama %99,9 identik olduğu ve yine ilgili izolatlarla beraber tür bazlı monofiletik grup oluşturdukları saptanmıştır. *Cy. tetracanthum*'un ayrıca filogenetik olarak en yüksek identikliği %96,4 ile Cyathostominae aile altındaki *C. radiatus* türüne gösterdiği tespit edilmiştir. Cyathostominae aile altında ITS-1, 5.8S, ITS-2 gen bölgesi sekans analizleriyle karakterize edilen türlerin filogenetik yapılanmaları Bu ve ark.'nın (212) bulguları ile de paralellik göstermiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile Türkiye'de ilk kez atlarda enfeksiyona yol açan strongyle türleri üzerine moleküler veriler sağlanmıştır. Araştırma sonuçları strongyle enfeksiyonlarının Nevşehir yöresi atlarında oldukça yaygın olduğunu ortaya çıkarmıştır. Örneklem yapılan çiftliklerde anthelmintiklerin gelişigüzel ve rutin kullanımı da dikkate alındığında elde edilen sonuçlar başta epidemiyolojik olarak Cyathostominae aile altındaki küçük strongyle türleri olmak üzere gelişmiş olan muhtemel antiparaziter dirençliliğin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Çalışma ile ayrıca *S. vulgaris*'in spesifik kantitatif teşhisi amacıyla sybergreen tabanlı real time PCR metodolojisi geliştirilmiş ve ilgili tekniğin epidemiyolojik ve survelians çalışmalarında alternatif olarak efektif bir şekilde kullanılabileceği kanaatine varılmıştır. Ayrıca bu çalışma ile yine Türkiye'de ilk kez *S. vulgaris* ve diğer bazı Cyathostominae türlerin ITS-1, 5.8S, ITS-2 gen bölgesi sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılmış ve filogenetik ilişkileri belirlenmiştir. Model olma karakteristiğine sahip bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, Türkiye'de at strongylidleri üzerine kapsamlı moleküler epidemiyolojik ve anthelmintiklere karşı dirençlilik çalışmalarına ihtiyaç olduğunu ortaya çıkarmıştır. Tüm bu çalışmalar sonucu atlarda strongyle enfeksiyonlarının kontrol altına alınabilmesi için

modern dünyada olduğu gibi selektif anthelmintik uygulamalarına geçilmesi ve *S. vulgaris* için surveilans programlarının hayata geçirilmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Andersen UV, Howe DK, Olsen SN, et al. Recent advances in diagnosing pathogenic equine gastrointestinal helminths: the challenge of prepatent detection. Vet. Parasitol 2013; 192: 1-9.
2. Love S, Murphy D, Mellor D. Pathogenicity of cyathostome infection. Vet Parasitol 1999; 85:113-121.
3. Proudman CJ, French NP, Trees AJ. Tapeworm infection is a significant risk factor for spasmodic colic and ileal impaction colic in the horse. Equine Vet J 1998; 30: 194-199.
4. Fritzen B, Rohn K, Schnieder T, et al. Endoparasite control management on horse farms--lessons from worm prevalence and questionnaire data. Equine Vet J 2010; 42: 79-83.
5. Lind EO, Kuzmina T, Uggla A, et al. A field study on the effect of some anthelmintics on cyathostomins of horses in sweden. Vet Res Commun 2007; 31: 53-65.
6. Matthee S, Dreyer FH, Hoffmann WA, et al. An introductory survey of helminth control practices in south africa and anthelmintic resistance on Thoroughbred stud farms in the Western Cape Province. J South African Vet Assoc 2002; 73: 195-200.
7. Duncan JL, Pirie HM. The life cycle of *Strongylus vulgaris* in the horse. Res Vet Sci 1972; 13: 374-379.
8. Gay CC, Speirs VC. Parasitic arteritis and its consequences in horses. Aust Vet J 1978; 54: 600-601.
9. Bevilaqua CML, Rodrigues ML, Concordet D. Identification of infective larvae of some common nematode strongylids of horses. Rev Med Vet 1993; 12: 989-995.

10. Gasser RB. Molecular tools--advances, opportunities and prospects. *Vet Parasitol* 2006; 136: 69-89.
11. Schnieder T, Heise M, Epe C. Genus-specific PCR for the differentiation of eggs or larvae from gastrointestinal nematodes of ruminants. *Parasitol Res* 1999; 85: 895-898.
12. Kaspar A, Pfister K, Nielsen MK, et al. Detection of *Strongylus vulgaris* in equine faecal samples by real-time PCR and larval culture - method comparison and occurrence assessment. *BMC Vet Res* 2017; 13 (19): (11 January 2017).
13. Nielsen MK, Olsen SN, Lyons ET, et al. Real-time PCR evaluation of *Strongylus vulgaris* in horses on farms in Denmark and Central Kentucky. *Vet Parasitol* 2012; 190: 461-466.
14. Nielsen MK, Peterson DS, Monrad J, et al. Detection and semi-quantification of *Strongylus vulgaris* DNA in equine faeces by real-time quantitative PCR. *Int J Parasitol* 2008; 38: 443-453.
15. Bellaw JL, Nielsen MK. Evaluation of Baermann apparatus sedimentation time on recovery of *Strongylus vulgaris* and *S. edentatus* third stage larvae from equine coprocultures. *Vet Parasitol* 2015; 211: 99-101.
16. Slocombe JOD, McCraw BM. Gastrointestinal nematodes in horses in Ontario. *Canadian Vet J* 1973; 14: 101-105.
17. Lichtenfels JR, Kharchenko VA, Dvojnok GM. Illustrated identification keys to strongylid parasites (Strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Vet Parasitol* 2008; 156: 4-161.
18. Lichtenfels JR, Gibbons LM, Krecek RC. Recommended terminology and advances in the systematics of the Cyathostomina (Nematoda: Strongyloidea) of horses. *Vet Parasitol* 2002; 107: 337-342.
19. Lichtenfels JR. Helminths of domestic equids. Illustrated keys to genera and species with emphasis on North American forms 1975. p. v + 92 pp.
20. Hung GC, Chilton NB, Beveridge I, et al. A molecular systematic framework for equine strongyles based on ribosomal DNA sequence data. *Int J Parasitol* 2000; 30: 95-103.

21. McDonnell A, Love S, Tait A, et al. Phylogenetic analysis of partial mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I and large ribosomal RNA sequences and nuclear internal transcribed spacer I sequences from species of Cyathostominae and Strongylinae (Nematoda, Order Strongylida), parasites of the horse. *Parasitol* 2000; 6: 649-659.
22. Studzińska MB, Tomczuk K, Demkowska-Kutrzepa M, et al. The Strongylidae belonging to *Strongylus* genus in horses from southeastern Poland. *Parasitol Res* 2012; 111: 1417-1421.
23. Brinck P. Till kännedom om den svenska hästens parasitfauna. Svenska Militärsällskapets Kvartalsskrift. 1949; 25: 43-72.
24. Ogbourne CP. Pathogenesis of cyathostome (*Trichonema*) infections of the horse. A review. Commonwealth Agricultural Bureaux, UK 1978.
25. Lind EO. Prevalence and Control of Strongyle Nematode Infections of Horses in Sweden. Uppsala: Swedish University; 2005.
26. Eysker M, Jansen J, Mirck MH. Inhibited development of cyathostominae in the horse in the early third stage. *Res Vet Sci* 1984; 37: 355-356.
27. Coles GC, Eysker M, Hodgkinson J, et al. Anthelmintic resistance and use of anthelmintics in horses. *Vet Rec* 2003; 153: 636.
28. Gibson TE. The effect of repeated anthelmintic treatment with phenothiazine on the faecal egg counts of housed horses, with some observations on the life cycle of *Trichonema spp.* in the horse. *J for Helminthol* 1953; 27: 29-40.
29. Armour J, Duncan M. Arrested larval development in cattle nematodes. *Parasitol Today* 1987; 3: 171-176.
30. Eysker M. Some aspects of inhibited development of trichostrongylids in ruminants. *Vet Parasitol* 1997; 72: 265-283.
31. Collobert-Laugier C, Hoste H, Sevin C, et al. Prevalence, abundance and site distribution of equine small strongyles in Normandy, France. *Vet Parasitol* 2002; 110: 77-83.

32. Eysker M, Boersema JH, Kooyman FNJ. Seasonally inhibited development of cyathostomine nematodes in Shetland ponies in The Netherlands. *Vet Parasitol* 1990; 36: 259-264.
33. Smith HJ. Experimental *Trichonema* infections in mature ponies. *Vet Parasitol* 1978; 4: 265-273.
34. Love S, Duncan JL. The development of naturally acquired cyathostome infection in ponies. *Vet Parasitol* 1992; 44: 127-142.
35. Uhlinger CA. Equine small strongyles: epidemiology, pathology and control. *Compend Contin Educ Vet* 1991; 13: 332-338.
36. Ogbourne CP. Observations on the free-living stages of strongylid nematodes of the horse. *Parasitol* 1972; 64: 461-477.
37. Mfitilodze MW, Hutchinson GW. Development and survival of free-living stages of equine strongyles under laboratory conditions. *Vet Parasitol* 1987; 23: 121-133.
38. Ramsey YH, Christley RM, Matthews JB, et al. Seasonal development of *Cyathostominae* larvae on pasture in a northern temperate region of the United Kingdom. *Vet Parasitol*. 2004; 119: 307-318.
39. Duncan JL. Field studies on the epidemiology of mixed strongyle infection in the horse. *Vet Rec* 1974; 94: 337-345.
40. Slocombe JOD, Valenzuela J, Lake MC. Epidemiology of strongyles in ponies in Ontario. *Can J Vet Res* 1987; 51: 470-474.
41. Herd RP. Epidemiology and control of equine strongylosis at Newmarket. *Equine Vet J* 1986; 18: 447-452.
42. Klei TR. Recent observations on the epidemiology, pathogenesis and immunology of equine helminth infections. Newmarket: R & W Publications (Newmarket) Ltd; 1992. p. 129-136.
43. Herd RP, Willardson KL. Seasonal distribution of infective strongyle larvae on horse pastures. *Equine Vet J* 1985; 17: 235-237.
44. Reinemeyer CR, Smith SA, Gabel AA, et al. The prevalence and intensity of internal parasites of horses in the U.S.A. *Vet Parasitol* 1984; 15: 75-83.

45. Nielsen MK, Pfister K, von Samson-Himmelstjerna G. Selective therapy in equine parasite control-application and limitations. *Vet Parasitol* 2014; 202: 95-103.
46. Gawor JJ. The prevalence and abundance of internal parasites in working horses autopsied in Poland. *Vet Parasitol* 1995; 58: 99-108.
47. Ogbourne CP. The prevalence, relative abundance and site distribution of nematodes of the subfamily Cyathostominae in horses killed in Britain. *J Helminthol* 1976; 50: 203-214.
48. Silva AV, Costa HM, Santos HA, et al. Cyathostominae (Nematoda) parasites of *Equus caballus* in some Brazilian states. *Vet Parasitol* 1999; 86: 15-21.
49. Bucknell DG, Gasser RB, Beveridge I. The prevalence and epidemiology of gastrointestinal parasites of horses in Victoria, Australia. *Int J Parasitol* 1995; 25: 711-724.
50. Mfitilodze MW, Hutchinson GW. Prevalence and abundance of equine strongyles (Nematoda: Strongyloidea) in tropical Australia. *J Parasitol* 1990; 76: 487-494.
51. Lichtenfels JR, Kharchenko VA, Sommer C, et al. Key characters for the microscopical identification of *Cylicocyclus nassatus* and *Cylicocyclus ashworthi* (Nematoda: Cyathostominae) of the horse, *Equus caballus*. *J Helm Soc Wash* 1997; 64: 120-127.
52. Lichtenfels JR, McDonnell A, Love S, et al. Nematodes of the tribe Cyathostominae (Strongylidae) collected from horses in Scotland. *Comp Parasitol* 2001; 68: 265-269.
53. Altas MG, Gokcen A, Sevgili M. Prevalence of helminth species in Arabian horses. *Indian Vet J* 2007; 84: 1093-1094.
54. Aydenizoz M. The prevalence of helminths in horses in Kirikkale, Turkey. *Indian Vet J* 2004; 81: 255-258.
55. Kozan E, Güzel H. Afyonkarahisar Yöresi Tektırnaklılarında Dışkı Bakısı ile Tespit Edilen Helminthler. *Kocatepe Vet J* 2015; 8: 18-21.
56. Umur Ş, Açıcı M. A survey on helminth infections of equines in the Central Black Sea region, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 2009; 33: 373-378.

57. Uslu U, Guçlu F. Prevalence of endoparasites in horses and donkeys in Turkey. Bull Vet Inst Pulawy 2007; 51: 237-240.
58. Ali S, Yagoob G. Survey on fecal gastrointestinal parasitic helminthes in horses of jokey clubs in Ardabil city, Iran. Biol Forum Int J 2015; 7: 106-110.
59. Arslan MÖ, Umur Ş. The helminth and Eimeria (Protozoa) species in horses and donkeys in Kars Province of Turkey. Acta Parasitol Turc 1998; 22: 180-184.
60. Çırak VY. Strongylidae infections of horses. Bornova Vet Bil Derg 2003; 28: 47-53.
61. Demir S, Tınar R, Aydın L, et al. Prevalence of helminth species by faecal examination in equines of Bursa. J Parasitol 1995; 19: 124-131.
62. Esatgöl MU, Efil İİ. A coprological study of helminth infections of horses in Istanbul, Turkey. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012; 18: A1-A6.
63. Gül A, Değer S, Ayaz E. The prevalences of helminth species according to faecal examination in equids in different cities in Turkey. Turk J Vet Anim Sci 2003; 27: 195-199.
64. Özer E, Küçüklerden N. Eimeria species and helminths in equines in Elazığ province [Turkey]. Turk J Vet Anim Sci 1993; 17: 217-221.
65. Pişkin FÇ, Bıyıkoglu G, Babür C, et al. Faecal examination for helminth infections in horses used for serum production. Acta Parasitol Turc. 1999; 23: 436-439.
66. Toktamış G, Yaman M. The distribution of gastrointestinal helminths in thoroughbred race horses. Van Vet J 2012; 23: 35-39.
67. Kuzmina TA, Dzeverin I, Kharchenko VA. Strongylids in domestic horses: influence of horse age, breed and deworming programs on the strongyle parasite community. Vet Parasitol 2016; 227: 56-63.
68. Turk MA, Klei TR. Effect of ivermectin treatment on eosinophilic pneumonia and other extravascular lesions of late *Strongylus vulgaris* larval migration in foals. Vet Pathol 1984; 21: 87-92.
69. Thamsborg SM, Leifsson PS, Grondahl C, et al. Impact of mixed strongyle infections in foals after one month on pasture. Equine Vet J 1998; 30: 240-245.

70. Reid SW, Mair TS, Hillyer MH, et al. Epidemiological risk factors associated with a diagnosis of clinical cyathostomiasis in the horse. *Equine Vet J* 1995; 27: 127-130.
71. Giles CJ, Urquhart KA, Longstaffe JA. Larval cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): a report of 15 clinical cases. *Equine Vet J* 1985; 17: 196-201.
72. Soulsby EJJ. *Helminths, arthropods, and protozoa of domesticated animals*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1982.
73. Kelly JC, Fogarty UMG. Outbreak of larval cyathostomiasis on a thoroughbred stud farm. *Ir Vet J* 1993; 46: 133-136.
74. Paul JW. Equine larval cyathostomosis. *Compend Contin Educ Vet* 1998; 20: 509-515.
75. Elsheikha HM, Hallowell GD. Strongylosis in equines: biology, diagnosis and future needs. *Vet Times* 2014; 44: 27-30.
76. Love S, Mair TS, Hillyer MH. Chronic diarrhoea in adult horses: a review of 51 referred cases. *Vet Rec* 1992; 130: 217-219.
77. Klei TR, Chapman MR. Immunity in equine cyathostome infections. *Vet Parasitol* 1999; 85: 123-133.
78. Monahan CM, Chapman MR, Taylor HW, et al. Foals raised on pasture with or without daily pyrantel tartrate feed additive: comparison of parasite burdens and host responses following experimental challenge with large and small strongyle larvae. *Vet Parasitol* 1997; 73: 277-289.
79. Chapman MR, French DD, Taylor HW, et al. One season of pasture exposure fails to induce a protective resistance to cyathostomes but increases numbers of hypobiotic third-stage larvae. *J Parasitol* 2002; 88: 678-683.
80. Tizard IR. *Veterinary immunology : an introduction*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2013.
81. Monahan CM, Taylor HW, Chapman MR, et al. Experimental immunization of ponies with *Strongylus vulgaris* radiation-attenuated larvae or crude soluble somatic extracts from larval or adult stages. *Journal Parasitol* 1994; 80: 911-923.

82. Herd RP. Performing equine fecal egg counts. *Vet Med* 1992; 87: 240-244.
83. Warnick LD. Daily variability of equine fecal strongyle egg counts. *Cornell Vet* 1992; 82: 453-463.
84. McFarlane D, Hale GM, Johnson EM, et al. Fecal egg counts after anthelmintic administration to aged horses and horses with pituitary pars intermedia dysfunction. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 236: 330-334.
85. Olsen SN, Schumann T, Pedersen A, et al. Recovery of live immature cyathostome larvae from the faeces of horses by Baermann technique. *Vet Parasitol* 2003; 116: 259-263.
86. Gasser RB, Hung GC, Chilton NB, et al. Advances in developing molecular-diagnostic tools for strongyloid nematodes of equids: fundamental and applied implications. *Mol Cell Probes* 2004; 18: 3-16.
87. Matthews JB, Hodgkinson JE, Dowdall SM, et al. Recent developments in research into the Cyathostominae and *Anoplocephala perfoliata*. *Vet Res* 2004; 35: 371-381.
88. Gasser RB, Stevenson LA, Chilton NB, et al. Species markers for equine strongyles detected in intergenic rDNA by PCR-RFLP. *Mol Cell Probes* 1996; 10: 371-378.
89. Hodgkinson JE. Molecular diagnosis and equine parasitology. *Vet Parasitol.* 2006; 136: 109-116.
90. Hung GC, Gasser RB, Beveridge I, et al. Species-specific amplification by PCR of ribosomal DNA from some equine strongyles. *Parasitology.* 1999;119 (Pt 1):69-80.
91. Hodgkinson JE, Lichtenfels JR, Mair TS, et al. A PCR-ELISA for the identification of cyathostomin fourth-stage larvae from clinical cases of larval cyathostominosis. *Int J Parasitol* 2003; 33: 1427-1435.
92. Posedi J, Drogemuller M, Schnieder T, et al. Microchip capillary electrophoresis-based genetic comparison of closely related cyathostomin nematode parasites of horses using randomly amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *J Parasitol Res* 2004; 92: 421-429.

93. Dowdall SM, Matthews JB, Mair T, et al. Antigen-specific IgG(T) responses in natural and experimental cyathostominae infection in horses. *Vet Parasitol* 2002; 106: 225-242.
94. Dowdall SM, Proudman CJ, Klei TR, et al. Characterisation of IgG(T) serum antibody responses to two larval antigen complexes in horses naturally- or experimentally-infected with cyathostomins. *Int J Parasitol* 2004; 34: 101-108.
95. Dowdall SM, Proudman CJ, Love S, et al. Purification and analyses of the specificity of two putative diagnostic antigens for larval cyathostomin infection in horses. *Res Vet Sci* 2003; 75: 223-229.
96. Monahan CM, Chapman MR, Taylor HW, et al. Comparison of moxidectin oral gel and ivermectin oral paste against a spectrum of internal parasites of ponies with special attention to encysted cyathostome larvae. *Vet Parasitol* 1996; 63: 225-235.
97. Duncan JL, McBeath DG, Best JM, et al. The efficacy of fenbendazole in the control of immature strongyle infections in ponies. *Equine Vet J* 1977; 9: 146-149.
98. Eysker M, Boersema JH, Kooyman FN. Effect of early season ivermectin and pyrantel treatments on strongylid infections in young Shetland ponies in The Netherlands. *Vet Parasitol* 1991; 38: 33-39.
99. Eysker M, Boersema JH, Kooyman FN. The effect of ivermectin treatment against inhibited early third stage, late third stage and fourth stage larvae and adult stages of the cyathostomes in Shetland ponies and spontaneous expulsion of these helminths. *Vet Parasitol* 1992; 42: 295-302.
100. Klei TR, Chapman MR, French DD, et al. Evaluation of ivermectin at an elevated dose against encysted equine cyathostome larvae. *Vet Parasitol* 1993; 47: 99-106.
101. Eysker M, Boersema JH, Kooyman FN. Seasonally inhibited development of cyathostomine nematodes in Shetland ponies in The Netherlands. *Vet Parasitol* 1990; 36: 259-264.
102. Duncan JL, Bairden K, Abbott EM. Elimination of mucosal cyathostome larvae by five daily treatments with fenbendazole. *Vet Rec* 1998; 142 : 268-271.
103. Chandler KJ, Collins MC, Love S. Efficacy of a five-day course of fenbendazole in benzimidazole-resistant cyathostomes. *Vet Rec* 2000; 147: 661-662.

104. Herd RP, Majewski GA. Comparison of daily and monthly pyrantel treatment in yearling thoroughbreds and the protective effect of strategic medication of mares on their foals. *Vet Parasitol* 1994; 55: 93-104.
105. Sangster N. A practical approach to anthelmintic resistance. *Equine Vet J* 2003; 35: 218-219.
106. Duncan JL, Love S. Preliminary observations on an alternative strategy for the control of horse strongyles. *Equine Vet J*. 1991; 23: 226-228.
107. Little D, Flowers JR, Hammerberg BH, et al. Management of drug-resistant cyathostomiasis on a breeding farm in central North Carolina. *Equine Vet J*. 2003; 35: 246-251.
108. Dopfer D, Kerssens CM, Meijer YG, et al. Shedding consistency of strongyle-type eggs in Dutch boarding horses. *Vet Parasitol* 2004; 124: 249-258.
109. Gomez HH, Georgi JR. Equine helminth infections: control by selective chemotherapy. *Equine Vet J* 1991; 23: 198-200.
110. Martin-Downum K, Yazwinski T, Tucker C, et al. Cyathostome fecal egg count trends in horses treated with moxidectin, ivermectin or fenbendazole. *Vet Parasitol* 2001; 101: 75-79.
111. Herd RP, Gabel AA. Reduced efficacy of anthelmintics in young compared with adult horses. *Equine Vet J* 1990; 22: 164-169.
112. Larsen M. Biological control of nematode parasites in sheep. *J Anim Sci* 2006; 84: 133-139.
113. Fernandez AS, Larsen M, Nansen P, et al. Effect of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* on the free-living stages of horse parasitic nematodes: a pilot study. *Vet Parasitol* 1997; 73: 257-266.
114. Larsen M, Nansen P, Grondahl C, et al. The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. *Parasitology* 1996; 113: 1-6.
115. Baudena MA, Chapman MR, Larsen M, et al. Efficacy of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in reducing equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. *Vet Parasitol* 2000; 89: 219-230.

116. Klei TR, Torbert BJ, Chapman MR, et al. Irradiated larval vaccination of ponies against *strongylus vulgaris*. J Parasitol 1982; 68: 561-569.
117. Klei TR, French DD, Chapman MR, et al. Protection of yearling ponies against *Strongylus vulgaris* by foalhood vaccination. Equine Vet J 1989 :2-7.
118. Chandrawathani P, Yusoff N, Wan LC, et al. Total anthelmintic failure to control nematode parasites of small ruminants on government breeding farms in Sabah, East Malaysia. Vet Res Commun 2004; 28: 479-489.
119. Kaplan RM, Nielsen MK. General guidelines for detection of anthelmintic resistance in horses. Vet Parasitol 2012; 185: 1.
120. Kohler P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. Int J Parasitol 2001; 31: 336-345.
121. Prichard RK, Hall CA, Kelly JD, et al. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. Aust Vet J 1980; 56: 239-251.
122. Martin RJ, Robertson AP, Bjorn H. Target sites of anthelmintics. Parasitology 1997; 114: 111-124.
123. Martin RJ. Modes of action of anthelmintic drugs. Vet J 1997; 154: 11-34.
124. Elard L, Humbert JF. Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1 β -tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. Parasitol Res 1999; 85: 452-456.
125. Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, et al. Drug resistance in veterinary helminths. Trends Parasitol 2004; 20: 469-476.
126. Drogemuller M, Failing K, Schnieder T, et al. Effect of repeated benzimidazole treatments with increasing dosages on the phenotype of resistance and the beta-tubulin codon 200 genotype distribution in a benzimidazole-resistant cyathostomin population. Vet Parasitol 2004; 123: 201-213.
127. Sangster NC. Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins? Vet Parasitol 1999; 85: 189-204.
128. Van Wyk JA. Refugia-overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. Onderstepoort J Vet Res 2001; 68: 55-67.

129. Dobson RJ, LeJambre L, Gill JH. Management of anthelmintic resistance: inheritance of resistance and selection with persistent drugs. *Int J Parasitol* 1996; 26: 993-1000.
130. Coles GC, Bauer C, Borgsteede FH, et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 1992; 44: 35-44.
131. Martin PJ, Anderson N, Jarrett RG. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Aust Vet J* 1989; 66: 236-240.
132. Tandon R, Kaplan RM. Evaluation of a larval development assay (DrenchRite) for the detection of anthelmintic resistance in cyathostomin nematodes of horses. *Vet Parasitol* 2004; 121: 125-142.
133. Kuzmina TA, Kharchenko VO. Anthelmintic resistance in cyathostomins of brood horses in Ukraine and influence of anthelmintic treatments on strongylid community structure. *Vet Parasitol* 2008; 154: 277-288.
134. Chapman MR, French DD, Monahan CM, et al. Identification and characterization of a pyrantel pamoate resistant cyathostome population. *Vet Parasitol* 1996; 66: 205-212.
135. Craven J, Bjorn H, Henriksen SA, et al. Survey of anthelmintic resistance on Danish horse farms, using 5 different methods of calculating faecal egg count reduction. *Equine Vet J* 1998; 30: 289-293.
136. Ihler CF, Bjorn H. Use of two in vitro methods for the detection of benzimidazole resistance in equine small strongyles (*Cyathostoma spp.*). *Vet Parasitol* 1996; 65: 117-125.
137. Kaplan RM. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 2004; 20: 477-481.
138. Boersema JH, Eysker M, Maas J, et al. Comparison of the reappearance of strongyle eggs on foals, yearlings and adult horses after treatment with ivermectin or pyrantel. *Vet Q* 1996; 18: 7-9.
139. Canevar RJ, Braga PR, Boeckh A, et al. Lack of *Cyathostomin sp.* reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. *Vet Parasitol* 2013; 194: 35-39.

140. Geurden T, van Doorn D, Claerebout E, et al. Decreased strongyle egg re-appearance period after treatment with ivermectin and moxidectin in horses in Belgium, Italy and The Netherlands. *Vet Parasitol* 2014; 204: 291-296.
141. Traversa D, Castagna G, von Samson-Himmelstjerna G, et al. Efficacy of major anthelmintics against horse cyathostomins in France. *Vet Parasitol* 2012; 188: 294-300.
142. Duszynski DW, Wilber PG. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *J Parasitol* 1997; 83: 333-336.
143. Hinney B, Wirtherle NC, Kyule M, et al. Prevalence of helminths in horses in the state of Brandenburg, Germany. *Parasitol Res* 2011; 108: 1083-1091.
144. Yıldırım A, Düzlü Ö, İnci A. İç Anadolu Yöresinde Sığır Coccidiosis'ine Yol Açan Patojen Eimeria Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Teşhiste Türe Özgü Real Time PCR Tekniğinin Geliştirilmesi. TÜBİTAK, 2015 Contract No.: 113 O 597 Sonuç Raporu.
145. Chilton NB, Gasser RB. Sequence differences in the internal transcribed spacers of DNA among four species of hookworm (Ancylostomatoidea: Ancylostoma). *Int J Parasitol* 1999; 29: 1971-1977.
146. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012; 28: 1647-1649.
147. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 2009; 25: 1451-1452.
148. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16: 111-120.
149. Nei M, Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford: Oxford University; 2005.
150. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 2016; 33: 1870-1874.

151. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 2008; 25: 1253-1256.
152. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 2001; 17: 754-755.
153. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003; 52: 696-704.
154. Buzatu MC, Mitrea IL, Lyons E, et al. Epidemiological study on parasite infections in horses from different types of equine establishments, Romania. *AgroLife Scientific Journal* 2016; 5: 31-35.
155. Farkas R, Kálmán CZ, Solymosi N. The occurrence of small and large strongyles in Hungarian stud farms. *Magyar Állatorvosok Lapja* 2016; 138: 565-573.
156. Gawor J. Prevalence of intestinal parasites in riding horses. *Med Weter* 2002; 58: 148-150.
157. Gawor J, Kornaś S, Charčenko V, et al. Intestinal parasites and health problems in horses in different breeding systems. *Med Weter* 2006; 62: 331-334.
158. Kornaś S, Nowosad B, Skalska M. Intestinal parasite infections in horses from different types of environments. *Med Weter* 2004; 60: 853-856.
159. Kornaś S, Nowosad B, Skalska M, et al. Intestinal parasite infection of horses from riding clubs in Kraków area. *Wiad Parazytol* 2004; 50: 323-327.
160. Sconza S, Caforio R, Cesare Ad, et al. Intestinal parasitoses in horse reared at the military riding centre of Montelibretti and at the Army's Veterinary Centre of Grosseto. *Ippologia* 2013; 24: 13-20.
161. Bracken MK, Wøhlk CBM, Petersen SL, et al. Evaluation of conventional PCR for detection of *Strongylus vulgaris* on horse farms. *Vet Parasitol* 2012; 184: 387-391.
162. Nielsen MK, Jacobsen S, Olsen SN, et al. Nonstrangulating intestinal infarction associated with *Strongylus vulgaris* in referred Danish equine cases. *Equine Vet J* 2016; 48: 376-379.
163. Reinemeyer CR, Prado JC, Andersen UV, et al. Effects of daily pyrantel tartrate on strongylid population dynamics and performance parameters of young horses

- repeatedly infected with cyathostomins and *Strongylus vulgaris*. Vet Parasitol 2014; 204: 229-237.
164. Gore T, Gore P, Giffin JM, et al. Horse owner's veterinary handbook. 2008.
 165. Boxell AC, Gibson KT, Hobbs RP, et al. Occurrence of gastrointestinal parasites in horses in metropolitan Perth, Western Australia. Aust Vet J 2004; 82: 91-95.
 166. Höglund J, Ljungström BL, Nilsson O, et al. Occurrence of *Gasterophilus intestinalis* and some parasitic nematodes of horses in Sweden. Acta Vet Scand 1997; 38: 157-166.
 167. Samson-Himmelstjerna Gv, Fritzen B, Demeler J, et al. Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. Vet Parasitol 2007; 144: 74-80.
 168. Kuzmina TA, Kharchenko VA, Starovir AI, et al. Analysis of the strongylid nematodes (Nematoda: Strongylidae) community after deworming of brood horses in Ukraine. Vet Parasitol 2005; 131: 283-290.
 169. Hinney B, Wirtherle NC, Kyule M, et al. A questionnaire survey on helminth control on horse farms in Brandenburg, Germany and the assessment of risks caused by different kinds of management. Parasitol Res 2011; 109: 1625-1635.
 170. Lloyd S, Smith J, Connan RM, et al. Parasite control methods used by horse owners: factors predisposing to the development of anthelmintic resistance in nematodes. Vet Rec 2000; 146: 487-492.
 171. O'Meara B, Mulcahy G. A survey of helminth control practices in equine establishments in Ireland. Vet Parasitol 2002; 109: 101-110.
 172. Tolliver SC, Lyons ET, Drudge JH. Prevalence of internal parasites in horses in critical tests of activity of parasiticides over a 28-year period (1956-1983) in Kentucky. Vet Parasitol 1987; 23: 273-284.
 173. Bredtmann CM, Krucken J, Murugaiyan J, et al. Nematode Species Identification- Current Status, Challenges and Future Perspectives for Cyathostomins. Front Cell Infect Microbiol 2017; 7: 283.

174. Matthews JB. Anthelmintic resistance in equine nematodes. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2014; 4: 310-315.
175. Nielsen MK, Monrad J, Olsen SN. Prescription-only anthelmintics--a questionnaire survey of strategies for surveillance and control of equine strongyles in Denmark. *Vet Parasitol* 2006; 135: 47-55.
176. Bucknell D, Hoste H, Gasser RB, et al. The structure of the community of strongyloid nematodes of domestic equids. *J Helminthol* 1996; 70: 185-192.
177. Fabiani JV, Lyons ET, Nielsen MK. Dynamics of *Parascaris* and *Strongylus spp.* parasites in untreated juvenile horses. *Vet Parasitol* 2016; 230: 62-66.
178. Akkaya H, Horoz H, Vuruşaner C. Treatment of *Strongylus spp.* and *Parascaris equorum* in race horses (thoroughbred) with febantel (Rintal ®) and determination of *Strongylus* larvae rates. *Acta Parasitol Tur* 1998; 22: 303-307.
179. Burgu A, Doğanay A, Öge H, et al. Helminth species found in horses. *Vet J Ankara Univ* 1995; 42: 193-205.
180. Çırak VY, Güleğen E, Bauer C. The prevalence of strongyle infections and persistent efficacy of pyrantel embonate, ivermectin and moxidectin in Turkish horses. *Turk J Vet Anim Sci* 2005; 29: 175-181.
181. Tınar R, Coşkun Ş, Aydın L, et al. Parasites of horses from Bursa, Turkey. *Uludag Univ J Fac Vet Med* 1994; 13: 11-16.
182. Mfitilodze MW, Hutchinson GW. The site distribution of adult strongyle parasites in the large intestines of horses in tropical Australia. *Int J Parasitol* 1985; 15: 313-319.
183. Eysker M, Boersema JH, Kooyman FN, et al. Possible resistance of small strongyles from female ponies in The Netherlands against albendazole. *Am J Vet Res* 1988; 49: 995-999.
184. Kuzmina TA, Kornas S, Basiaga M, et al. Biodiversity of strongylids (Nematoda: Strongylidae) communities in domestic horses from Poland and Ukraine. *Helminthol* 2011; 48: 77-84.

185. Kuzmina TA, Kharchenko VA, Zvegintsova NS. Comparative study of the intestinal strongylid communities of equidae in the Askania-Nova biosphere reserve, Ukraine. *Helminthol* 2007; 44: 62-69.
186. Lyons ET, Tolliver SC, Collins SS, et al. Transmission of endoparasites in horse foals born on the same pasture on a farm in central Kentucky (1996-1999). *Vet Parasitol* 2001; 97: 113-121.
187. Barbosa OF, Rocha UF, Silva GSd, et al. A survey on Cyathostominae nematodes (Strongylidae, Strongylidae) in pasture bred horses from São Paulo State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina* 2001; 22: 21-26.
188. Lyons ET, Kuzmina TA, Tolliver SC, et al. Observations on development of natural infection and species composition of small strongyles in young equids in Kentucky. *Parasitol Res* 2011; 109: 1529-1535.
189. Francisco I, Arias M, Cortinas FJ, et al. Intrinsic Factors Influencing the Infection by Helminth Parasites in Horses under an Oceanic Climate Area (NW Spain). *J Parasitol Res* 2009.
190. Kornas S, Cabaret J, Skalska M, et al. Horse infection with intestinal helminths in relation to age, sex, access to grass and farm system. *Vet Parasitol* 2010; 174: 285-291.
191. Osterman Lind E, Hoglund J, Ljungstrom BL, et al. A field survey on the distribution of strongyle infections of horses in Sweden and factors affecting faecal egg counts. *Equine Vet J* 1999; 31: 68-72.
192. Rubenstein DI, Hohmann ME. Parasites and social behavior of island feral horses. *Oikos* 1989; 55: 312-320.
193. Saeed K, Qadir Z, Ashraf K, et al. Role of intrinsic and extrinsic epidemiological factors on strongylosis in horses. *J Anim Plant Sci* 2010; 20: 277-280.
194. Tola M, Ketema T, Firaol T. Prevalence of gastrointestinal parasites of horses and donkeys in and around Gondar town, Ethiopia. *Open J Vet Med* 2013; 3: 267-272.
195. Eydal M, Gunnarsson E. Helminth infections in a group of Icelandic horses with little exposure to anthelmintics. *Icel Agric Sci* 1994; 8: 85-91.

196. Yadav KS, Shukla PC, Gupta DK, et al. Prevalence of gastrointestinal nematodes in horses of Jabalpur region. *Res J Vet Pract* 2014; 2: 44-48.
197. Slivinska K, Kharchenko V, Wróblewski Z, et al. Parasitological survey of Polish primitive horses (*Equus caballus gmelini* Ant.): influence of age, sex and management strategies on the parasite community. *Helminthol* 2016; 53: 233-242.
198. Ionita M, Buzatu MC, Enachescu V, et al. Coprological prevalence and intensity of gastrointesinal parasites in horses in some Romanian studs: preliminary data. *AgroLife Sci J* 2013; 2: 207-212.
199. Bolwell CF, Rosanowski SM, Scott I, et al. Questionnaire study on parasite control practices on Thoroughbred and Standardbred breeding farms in New Zealand. *Vet Parasitol* 2015; 209: 62-69.
200. Robert M, Hu W, Nielsen MK, et al. Attitudes towards implementation of surveillance-based parasite control on Kentucky Thoroughbred farms - Current strategies, awareness and willingness-to-pay. *Equine Vet J* 2015; 47: 694-700.
201. Stear MJ, Wakelin D. Genetic resistance to parasitic infection. *Rev Sci Tech* 1998; 17: 143-153.
202. Von Samson-Himmelstjerna G, Fritzen B, Demeler J, et al. Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Vet Parasitol* 2007; 144: 74-80.
203. Zarlenga DS, Higgins J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Vet Parasitol* 2001; 101: 215-230.
204. Campbell AJ, Gasser RB, Chilton NB. Differences in a ribosomal DNA sequence of *Strongylus* species allows identification of single eggs. *Int J Parasitol* 1995; 25: 359-365.
205. Navarro E, Serrano-Heras G, Castano MJ, et al. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* 2015; 439: 231-250.
206. Papin JF, Vahrson W, Dittmer DP. SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile Virus circumvents false-negative results due to strain variability. *Clin Microbiol Infect* 2004; 42: 1511-1518.

207. McManus DP, Bowles J. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. *Int J Parasitol* 1996; 26: 687-704.
208. Nadler SA. Molecular approaches to studying helminth population genetics and phylogeny. *Int J Parasitol* 1990; 20: 11-29.
209. Blair D, Bray RA, Barker SC. Molecules and morphology in phylogenetic studies of the Hemiuroidea (Digenea: Trematoda: Platyhelminthes). *Mol Phylogenet Evol* 1998; 9: 15-25.
210. Nadler SA, Hudspeth DS. Ribosomal DNA and phylogeny of the Ascaridoidea (Nemata: Secernentea): implications for morphological evolution and classification. *Mol Phylogenet Evol* 1998; 10: 221-236.
211. Chilton NB, Gasser RB, Beveridge I. Phylogenetic relationships of Australian strongyloid nematodes inferred from ribosomal DNA sequence data. *Int J Parasitol* 1997; 27: 1481-1494.
212. Bu Y, Niu H, Zhang L. Phylogenetic analysis of the genus *Cylicocyclus* (Nematoda: Strongylidae) based on nuclear ribosomal sequence data. *Acta Parasitol* 2013; 58: 167-173.
213. Hung GC, Chilton NB, Beveridge I, et al. Secondary structure model for the ITS-2 precursor rRNA of strongyloid nematodes of equids: implications for phylogenetic inference. *Int J Parasitol* 1999; 29: 1949-1964.
214. Hung GC, Chilton NB, Beveridge I, et al. Molecular delineation of *Cylicocyclus nassatus* and *C. ashworthi* (Nematoda: Strongylidae). *Int J Parasitol* 1997; 27: 601-605.
215. Hung GC, Chilton NB, Beveridge I, et al. Molecular evidence for cryptic species within *Cylicostephanus minutus* (Nematoda: Strongylidae). *Int J Parasitol* 1999; 29: 285-291.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Mehmet BİLGİN

Uyruğu: (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 18 Ağustos 1959, Topaklı (Niğde)

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 530 600 86 29

email: kemerkemerhisar@hotmail.com

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

EĞİTİM:

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lise	Niğde Lisesi	1977
Lisans	Fırat Üniversitesi Üniversitesi Veteriner Fakültesi	1982
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Parazitoloji	

YABANCI DİL:

İngilizce