



**ÇORUM BELEDİYESİ VETERİNER İŞLERİ MÜDÜRLÜĞÜ'NE BAĞLI HAYVAN
BARINAĞI'NDA REHABİLİTE EDİLEN SOKAK KÖPEKLERİNİ ENFESTE EDEN KENELERİN
BELİRLENMESİ VE BU KENELERİN TAŞIDIĞI ZONOTİK PATOJENLERİN ARAŞTIRILMASI**

"Çorum İçin Bir Projem Var" 4. Dönem Sonuç Raporu

Yürütücü:

Dr. Öğr. Üyesi Gönül ARSLAN AKVERAN

Proje ekibi

Dr. Öğr. Üyesi Djursun KARASARTOVA-Hitit Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Arzu COMBA-Hitit Üniversitesi

Doç. Dr. Bahat COMBA-Hitit Üniversitesi

Dr. Adem KESKİN-Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN-Hitit Üniversitesi

Ocak, 2019

Çorum

Bu alışma için Yerel Etik Kurul izni alınmıştır.

(Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Karar No: 18/087- 16.07.2018)

ÖZET

Bu çalışmada 2018 yılı Nisan-Aralık ayları arasında Çorum Belediyesi'ne bağlı Veteriner İşleri Müdürlüğü bünyesindeki geçici hayvan bakım evine getirilen köpekler üzerinden toplanan keneler ve köpeklerden alınan kan örneklerinde *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Theileria* spp., *Hemolivia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp. gibi kene kaynaklı patojen mikroorganizmaların varlığı moleküler tekniklerle araştırıldı.

Kan örneği alınan ve kene taraması yapılan köpeklerin %21.43(15/70)'ü keneler ile enfesteydi. Enfeste bireylerdeki ortalama kene yoğunluğunun 3.6 (1-5) olduğu tespit edildi. Köpekler üzerinde Ixodidae ailesinden *Ixodes kaiseri*, *Hyalomma* spp., *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus turanicus* ve *Haemaphysalis parva* türü kenelere rastlandı. En fazla kene Haziran ve Ağustos ayında, en az kene ise Nisan ve Mayıs aylarında kaydedildi. Kenelerin ve kan örneklerinin tamamı *Anaplasma* spp. ve *Ehrlichia* spp. yönünden negatif bulundu. Kan örneklerinin % 25.7'i *Babesia* spp. yönünden pozitif bulundu. Kenelerin % 11.1'i *Rickettsia* spp. ve %7.4'ü *Babesia* spp. yönünden pozitif bulundu.

Bu çalışmada, köpekler üzerinden toplanan kene sayısı, kene ve kan örneklerinde tespit edilen hastalık yapıcı mikroorganizma çeşitliliği ve oranı oldukça düşüktür. Buna göre Veteriner İşleri Müdürlüğü'nün sokak köpeklerinin üzerindeki kenelerle mücadelesinin başarılı olduğu açıktır. Veteriner İşleri Müdürlüğü, kene kaynaklı zoonotik hastalıkların döngüsüne aracılık etme potansiyeli olan sokak köpeklerine uyguladığı tedavi ve koruyucu Veteriner Hekimlik hizmeti sayesinde, bu hastalıkların önemli bir halk sağlığı problemine dönüşmesinin önlenmesine önemli katkı sunmaktadır.

ABSTRACT

In this study, the presence of tick-borne pathogen microorganisms such as *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Theileria* spp., *Hemolivia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp. was investigated by molecular techniques in ticks collected from dogs and the blood samples of dogs in The Directorate of Veterinary Service incorporating Animal Nursing Home related to Çorum Municipality between April-December 2018. 21.43%(15/70) of all dogs were infested with ticks. Mean tick intensity was 3.6 (1-5) within infested dogs. *Ixodes kaiseri*, *Hyalomma* spp., *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus turanicus* and *Haemaphysalis parva* ticks from *Ixodidae* family were collected from dogs. The most tick was recorded in April and May, while the least tick was recorded in June and August. All ticks and blood samples were negative for *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp.; 25.7% of blood samples were positive for *Babesia* spp., 11.1% of ticks were *Rickettsia* spp. positive and 7.4% were *Babesia* spp. positive. In this study, the number of ticks collected from dogs and, the number of disease-causing microorganisms detected in ticks and blood samples are very low. According to this, it is clear that struggling of The Directorate of Veterinary Service with the ticks of stray dogs is successful. The Directorate of Veterinary Service contributes to the prevention of the transformation of tick-borne zoonotic diseases into an important public health problem thanks to treatment and preventive Veterinary Medicine services for stray dogs.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	6
2. GEREÇ ve YÖNTEM	9
2.1. Araştırma Alanı	9
Şekil 2.1. Çorum ili haritası ve çalışma bölgesi (Anonim, Çorum İl Özel İdaresi, 2009).	9
2.2. Çorum Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü	9
2.3. Çorum Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü Görevleri	10
2.4. Çorum Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü Geçici Bakım Evi.....	10
2.5. Sokak Hayvanları Geçici Bakım Evi'nde Örnek Toplama Sırasında Kullanılan Araç, Gereç ve Sarf Malzemeler	11
2.6. Kenelerin Toplanması ve Saklanması	11
2.7. Kan Örneklerinin Toplanması ve Saklanması.....	12
Şekil 2.2. Köpeklerin ön bacağındaki sefalik venden kan alımı	12
2.8. Kan Yaymaları	12
Şekil 2.3. Kan yaymalarının hazırlanması	13
2.9. Laboratuvarda Kullanılan Araç ve Gereçler	13
2.10. Laboratuvarda kullanılan sarf malzemeler ve kitler	14
2.11. Kenelerde Tür Tayini.....	14
2.12. Kenelerden DNA Ekstraksiyonu.....	14
2.13. Kandan DNA Ekstraksiyonu	16
Şekil 2.4. DNA binding spin columnların santrifüjü	17
2.14. Moleküler Analiz	17
Tablo 2.1. PCR deneylerinde kullanılan Primer dizileri ve PCR koşulları.....	18
Tablo 2. 2. <i>Rickettsia</i> spp. için hazırlanan PCR bileşenleri.	18
Tablo 2. 3. <i>Anaplasma</i> spp. ve <i>Ehrlichia</i> spp. için hazırlanan PCR bileşenleri.....	19
Tablo 2. 4. <i>Babesia</i> spp., <i>Hepatozoon</i> spp., <i>Theileria</i> spp., <i>Hemolivia</i> spp. için hazırlanan PCR bileşenleri.	19
2.15. PCR Ürünlerin Saptanması.....	19
Şekil 2.5. Jel elektroforezi	22
2.16. Kan Yaymalarının İncelenmesi	22
3. SONUÇLAR.....	23
3.1. Köpeklerdeki Kene Yoğunluğu	23
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan köpeklerin yaş dağılımı ve keneli birey sayısı	23
3.2. Köpekleri Enfeste Eden Kene Türleri.....	23

Tablo 3.2. Köpekler üzerine tutunan kenelerin türlerine ve gelişme evrelerine göre dağılımları	24
3.3. Kenelerin Aylara Göre Dağılımı	24
Tablo 3.3. Köpekler üzerine tutunan kenelerin aylara göre dağılımı	24
Şekil 3.1. Köpekler üzerine tutunan kenelerin aylara göre dağılımı	25
3.4. Kenelerde Moleküler Olarak Saptanan Patojenler	25
Tablo 3.4. Kenelerde bulunan patojenlerin moleküler analizi ile ilgili bulgular	26
3.5. Kan Örneklerinde Moleküler Olarak Saptanan Patojenler	26
Tablo 3.5. Kanda bulunan patojenlerin moleküler analizi ile ilgili bulgular	26
3.6. Elektroforez Görüntüleri	27
Şekil 3.2. <i>Ehrlichia</i> spp. ve <i>Anaplasma</i> spp. için hazırlanan PCR ürünlerinin jel görüntüsü	27
Şekil 3.3. <i>Babesia</i> spp. için hazırlanan PCR ürünlerinin jel görüntüsü	28
Şekil 3.4. <i>Rickettsia</i> spp. için hazırlanan PCR ürünlerinin jel görüntüsü	29
3.7. Kan Yayma Sonuçları	30
Şekil 3.5. Kan yaymalarının mikroskopik görüntüsü	30
Şekil 3.6. <i>Babesia</i> spp. ile enfekte eritrositlerin mikroskopik görüntüsü	31
4. TARTIŞMA	32
5. TEŞEKKÜR	36
6. KAYNAKLAR	37

1. GİRİŞ

Keneler birçok zoonotik patojen mikroorganizmanın rezervuarı ve vektörüdür. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi, *Rickettsiosis*, *Anaplasmosis*, *Babesiosis*, *Ehrlichiosis* ve *Lyme borreliosis* gibi kene kaynaklı zoonotik hastalıkların, hayvan ve insan sağlığı açısından önemi giderek artmaktadır. Bu hastalıklara neden olan bakteri ya da virüsleri taşıyan vektör keneler köpekleri enfeste ettiğinde, köpeklerde herhangi bir hastalık belirtisi ortaya çıkmasa da, aynı keneler ortak yaşam alanı içerisindeki insanları enfeste ettiğinde insanlarda hastalık gözlenebilir.

Savunmasız sokak köpekleri, gelişim dönemlerinin bazı evrelerinde insanları da enfeste edebilen, çok sayıda ve farklı türde vektör kene tarafından enfeste edilebilir. Başboş hayvanları enfeste eden keneler, çevredeki kene varlığı ve kene çeşitliliği hakkında bilgi verecektir.

Çorum Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü hayvan hastanesi düzeyindeki geçici bakım evi sayesinde, sokak hayvanlarının rehabilitasyonunu sağlamaktadır. Barınağa getirilen köpeklere gerekli karma aşılar ve kuduz aşısı yapılmaktadır. Bakım evindeki ve besleme noktalarındaki köpeklere iç ve dış parazit tedavisi için ilaç verilmektedir. Geçici bakım evindeki 2017 yılında 2204, son 10 yılda ise 16709 sokak hayvanına iç ve dış parazit tedavisi uygulanmıştır.

Keneler, dünyada yaygın olarak bulunurlar ve larva, nimf ve ergin dönemlerinde hayatta kalmak ve üremek için başta memeliler ve kuşlar olmak üzere tüm omurgalılar üzerinde zorunlu kan emici ekto-parazitler. Dünyada 800'den fazla kene türü tanımlanmıştır ve bu kenelerden bazıları aynı zamanda çeşitli patojen mikroorganizmanın vektörüdürler. Biyolojik vektör olan keneler 200'den fazla *bakteriyel*, *riketsiyal*, *spiroketal*, *protozoer* ve *helmint* etkeni taşırlar. Gelişimlerinin farklı dönemlerinde farklı konaklardan kan emebilen keneler, konaklara hastalıkları bulaştırabilirler, konaklar arasında hastalık taşıyabilirler.

Vücutlarındaki kitin dağılımına göre Ixodidae'ler sert keneler, Argasidae'ler yumuşak keneler olarak isimlendirilirler. Argasidae ailesinde daha az olan kitin homojen dağılmıştır. Ixodidae ailesinde ise bireylerin gelişme dönemlerine ve cinsiyetlerine de bağlı olarak vücudun çeşitli bölgelerinde kitinizasyonun arttığı ve kitin plaklarının oluştuğu görülmüştür. Kene larvalarında üç çift, nimf ve erginlerinde dört çift bacak vardır. Tarsusun ucunda bir tırnak ve *pulvillum* adı verilen vantuz şeklinde taban yastığı bulunur. *Pulvillum* Ixodidae kenelerinde iyi gelişmişken,

Argasidae'lerin nimf ve olgunlarında yoktur. Ixodidae kenelerinde I. çift bacağıın tarsusunun dorsalinde *Haller organeli* adı verilen ve duyarlı reseptörlere sahip, konağın bulunmasına yardımcı bir duyu alanı bulunur. Ixodidae grubundaki dişi keneler, konak üzerinde çiftleştikten sonra, 24-48 saat içinde kan emerek doyarlar ve yumurtlamak üzere konaktan ayrılırlar. Kuru ot, yaprak ve taşların altına 1-2 günde yumurtlamaya başlarlar. Dişinin yumurtlama miktarı ve süresi kan emme miktarına, dış faktörlere ve kene türüne bağlıdır; ortalama 200-1500 arası yumurta yumurtlarlar. Ixodidae kenelerinin dişileri yumurtladıktan sonra, erkekleri de çiftleştikten sonra ölürler (Mullen and Durden 2009).

Türkiye'deki kene faunası 47 tür içerir ve bunların 31'i insanları enfeste eder. Keneler tüm Türkiye'de yaygındır ve her yıl binlerce insan kene ısırması ve buna bağlı hastalıklardan etkilenir. Türkiye'deki en yaygın kene kaynaklı hastalıklar arasında Kırım Kongo Kanamalı Ateşi, Lime boreliasis, Riketsiosis, Babesiosis ve Anaplasmosis sayılabilir (Vatansever et al. 2008, Kar et al. 2011, Karaer et al. 2011, Gargili et al. 2012, Orkun et al. 2014a).

2002 yılında KKKA hastalığının ilk kez keşfedilmesinden bu yana Türkiye'de binlerce KKKA Hastalığı kaydedilmiştir. T.C. Sağlık bakanlığı verilerine göre 2002 ve 2014 yılı arasında 440 kişi bu hastalığa bağlı olarak hayatını kaybetmiştir (Keskin et al. 2015).

Çorum ve Yozgat illerinde insanları enfeste eden kenelerin çoğu *Hyalomma marginatum* türüne aittir (Bursali et al. 2012, Keskin et al. 2015). Bu bölgedeki diğer yaygın keneler sırasıyla *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus turanicus*, *Hyalomma excavatum* ve *Hyalomma aegyptium* 'dur.

Türkiye'nin tüm coğrafi bölgelerinde *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus turanicus*, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma aegyptium*, *Hyalomma anatolicum*, *Hyalomma detritum*, *Hyalomma excavatum*, *Hyalomma marginatum*, *Haemaphysalis parva*, *Haemaphysalis punctata*, *Haemaphysalis sulcata*, *Argas percicus* ve *Ornithodoros lahorensis* türlerine rastlanmaktadır.

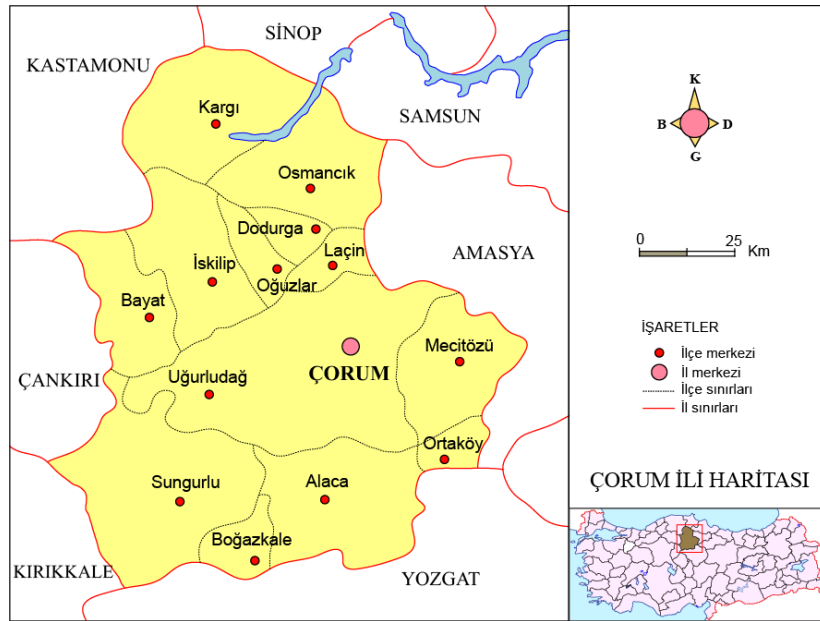
Kenelerin tüm dünyada 200'den fazla hastalığın taşınmasından sorumlu olduğu bilinmektedir. Geçici bakım evine şehrin farklı noktalarından çok sayıda sokak hayvanı getirilmektedir. Bu çalışmada barınağa getirilen köpekleri enfeste eden kene türlerini belirlemek, toplanan kenelerde ve köpeklerden alınan kan örneklerinde insanlarda da hastalık yapabilen zoonotik

patojenlerin varlığını ortaya koymak hedeflenmiştir. Bu sayede Çorum İli'nde kene kaynaklı hastalıklar açısından risk faktörlerini belirlemek amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Araştırma Alanı

Çorum ili, Orta Karadeniz Bölgesi'nin iç kısmında yer alır; Doğuda Amasya, güneyde Yozgat, batıda Çankırı, kuzeyde Sinop, kuzeydoğuda Samsun, güneybatıda Kırıkkale illeri ile komşudur (Şekil 2.1). 34° 04' 28'' doğu boylamları ile 39° 54' 20'' kuzey enlemleri arasında yer alan Çorum ili'nin yüzölçümü 12.820 km²'dir. Deniz seviyesinden yüksekliği ortalama 801 m' dir. Yıllık ortalama yağış 450 mm, ortalama sıcaklık 10-11° C civarındadır. Şehir; orman, step, akarsu, göl, sulak alan ve tuzlu topraklar gibi farklı habitatlara sahiptir. Karadeniz ve karasal iklimin etkisi altında olduğundan yazları sıcak ve kurak, kışları soğuk ve yağışlıdır. Meralar sınırlı olmasına rağmen koyun ve sığır yetiştiriciliği yaygın olarak yapılmaktadır.



Şekil 2.1. Çorum ili haritası ve çalışma bölgesi (Anonim, Çorum İl Özel İdaresi, 2009).

2.2. Çorum Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü

Çorum Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü, 22.02.2007 tarihli 26442 Sayılı Resmî Gazetede yayımlanan "Belediye ve Bağlı Kuruluşları ile Mahalli İdare Birlikleri Norm Kadro İlke ve Standartlarına dair Yönetmelik" Hükümleri gereğince Çorum Belediye Meclisinin 02.05.2007 tarih ve 06 Sayılı Kararıyla yeniden kurulmuştur. Çorum Belediye Başkanlığı Veteriner İşleri Müdürlüğü; Çorum Belediye Başkanlığı'nın amaçları, prensip ve politikaları ile bağlı bulunan

ilgili yürürlükteki mevzuat ve Belediye Başkanı'nın belirleyeceği esaslar çerçevesinde, Başkanlık Makamının emir ve direktifleri doğrultusunda hareket etmektedir.

2.3. Çorum Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü Görevleri

- Başboş sokak hayvanlarının rehabilitasyonu amacıyla 5199 sayılı Hayvanları Koruma Kanunu ve ilgili uygulama yönetmeliği doğrultusunda Sahipsiz Sokak Hayvanları Geçici Bakım Evi açmak,
- Sahipsiz Sokak Hayvanlarının sağlıklarını korumak ve üremelerini kontrol altına almak maksadıyla yürürlükteki kanun ve yönetmelikler çerçevesinde, toplamak, kısırlaştırmak, aşılama, işaretlemek, sahiplendirmek veya alındığı ortama bırakmak,
- Sahipli hayvanları kayıt altına almak,
- Isırma ve ısırık vakalarında ilgili Kamu Birimleriyle işbirliği içerisinde (Kuduz şüpheli) hayvanları müşahede altına almak, müşahede süresince takip etmek,
- Kurban kesim alanlarının düzenlenmesi amacıyla ilgili müdürlüklerle işbirliği yapmak ve kurban kesim alanlarında denetimler yapmak,
- Hayvanat bahçesi kurmak, halka hayvan sevgisini kazandırmak için parklarda etkinlikler ve düzenlemeler yapmak,
- Belediye sınırları içinden sevk edilen hayvan ve hayvansal kökenli, gıda ve mamul madde için, menşei şahadetnamesi düzenlemek.

[\(https://corum.bel.tr/kurumsal/mudurlukler/veteriner-isleri-mudurlugu/\)](https://corum.bel.tr/kurumsal/mudurlukler/veteriner-isleri-mudurlugu/)

2.4. Çorum Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü Geçici Bakım Evi

Çorum Belediyesi Veteriner İşleri bünyesinde Bahabey Çamlığı'nda 2007 yılında oluşturulan Sahipsiz Sokak Hayvanları Geçici Bakım Evi'nde, sahipsiz hayvanların bakımı ve tedavileri yapılmaktadır. Tedavi süresince hayvanlar klimalı odalarda konforlu koşullarda tutulmaktadır. Geçici bakım evi 08:00-17:00 saatleri arasında ziyaretçilere açıktır. Bakım evinde ihtiyaç durumunda, yabanıl hayvanların da bakımı yapılarak tekrar doğaya salınımı gerçekleştirilmektedir. Geçici bakım evine ait alanın bir kısmı, farklı hayvan türlerinin bulunduğu küçük bir hayvanat bahçesine dönüştürülmüş durumdadır.

Geçici bakım evine şehrin farklı noktalarından çok sayıda sokak hayvanı kısırlaştırma, tedavi, aşılama vb. için getirilmektedir. Bu sırada, karma aşıları, kuduz aşıları, iç ve dış parazit tedavileri yapılmaktadır. Geçici bakım evinde 2017 yılında 2204, son 10 yılda ise 16709 sokak hayvanına iç ve dış parazit tedavisi uygulanarak tekrar doğal yaşam alanlarına bırakılmışlardır. Barınağa getirilen köpekler çip ve küpe takılarak takip edilmektedir.

Bu çalışmada 2018 yılı Nisan-Aralık ayları arasında Çorum Belediyesi'ne bağlı Veteriner İşleri Müdürlüğü bünyesindeki geçici bakım evine getirilen köpekler üzerinden toplanan keneler ve köpeklerden alınan kan örneklerinde *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Theileria* spp., *Hemolivia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp. gibi kene kaynaklı patojen mikroorganizmaların varlığı moleküler tekniklerle araştırılmıştır.

2.5. Sokak Hayvanları Geçici Bakım Evi'nde Örnek Toplama Sırasında Kullanılan Araç, Gereç ve Sarf Malzemeler

- 10 ml'lik enjektör
- Mor kapaklı EDTA'lı tüp
- Lam, Lamel
- Şaleler
- *Absolute* metanol
- Giamsa boyası
- Ultra saf su
- Pens
- *Absolute* etil alkol
- Pamuk
- Lateks eldiven
- *Cryo* tüpler

2.6. Kenelerin Toplanması ve Saklanması

Nisan-Aralık 2018 tarihleri arasında rehabilitasyon amacıyla bakım evine getirilen köpeklerde dış parazit kontrolü yapıldı. Kurumda çalışan Veteriner Hekimler eşliğinde bütün vücutları incelenen köpeklerin üzerinde bulunan keneler bir pens yardımıyla çıkarıldı. Kenelerin cinsiyetleri, tutunma bölgeleri ve yoğunlukları kaydedildi. Toplanan keneler daha sonraki moleküler analizler için *absolute* etil alkol içeren *cryo* tüplerde +4^o de saklandı.

2.7. Kan Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Nisan-Aralık 2018 tarihleri arasında rehabilitasyon amacıyla bakım evine getirilen ve kene taraması yapılan köpekler arasında, kene taşıyan ve/veya taşımayan toplam 70 köpekten kan örneği alındı. Her bir köpeğin ön bacağındaki sefalik venden 10 ml'lik enjektörlerle alınan tam kan örnekleri moleküler analizlere kadar, mor kapaklı EDTA'lı tüplerde -20°C' de muhafaza edildi (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Köpeklerin ön bacağındaki sefalik venden kan alımı

2.8. Kan Yaymaları

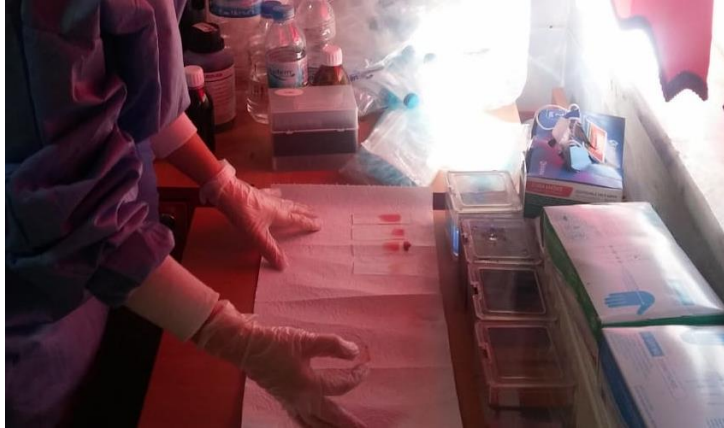
Nisan-Aralık 2018 tarihleri arasında kan örneği alınan 70 köpek için, enjektörün ucunda kalan kan kalıntıları kullanılarak kan yayma preparatları (Froti) hazırlandı (Şekil 2.3.).

Kan yayması hazırlanırken;

- Lamın uç kısmının yakın bölümüne bir damla kan kondu.
- Lam yan kenarından kan damlası üstte gelecek şekilde ve damlanın olmadığı köşeden sol el baş ve işaret parmağı ile tutuldu.
- Sol elin küçük parmağı ile lam alttan desteklendi.
- Sağ eldeki lamel, kan damlasının önüne 40 - 45° lik açı ile tutuldu.
- Lamel biraz geriye çekilerek kanın lamın uç kısmına dağılması sağlandı ve lamel tek bir hareketle titretmeden ileriye doğru itilerek kanın yayılması sağlandı.
- Yayma, lamın 2/3' üne kadar sürdürüldü.

Frotiller havada kurutulduktan sonra, şalelerde *absolute* metanol içerisinde 5 dakika boyunca fikse edildi, daha sonra ultra saf su (PH:7) ile 1/10 oranında seyreltilmiş Giemsa boyası ile 15 dakika boyunca boyandı. Daha sonra ultra saf su ile yıkanarak havada kuruması beklendi.

Bu işlemler Veteriner İşleri Genel Müdürlüğü'ne ait bakım evi bünyesinde oluşturulan geçici laboratuvarında gerçekleştirildi.



Şekil 2.3. Kan yaymalarının hazırlanması

Çalışmanın bundan sonraki kısmı Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

2.9. Laboratuvarında Kullanılan Araç ve Gereçler

- Mikrosantrifüj
- Kuru Isıtıcı Blok
- Elektroforez Tankı
- Thermocycler
- UV translüminatör
- Yatay Vorteks
- Fotoğraf Makinası
- Laminar Flow Kabini
- Kalibre mikropipetler (10,100 ve 1000 ul)
- Leica MZ16 marka stereo mikroskop
- PCR Cihazı, Eppendorf, Mastercycler, nexus GSX1
- Sıvı Azot Tankı

2.10. Laboratuvarında kullanılan sarf malzemeler ve kitler

- Steril DNase ve RNA se free 1,5'lik eppendorflar
- Steril DNase, RNase free 2 ml'lik eppendorflar
- Steril PCR tüpü (0.2 ml'lik DNase, RNA se free)
- Steril DNase ve RNase free filtreli pipet ucu (10,100, ve 1000 ul'lik)
- Etidiyum Bromür
- 50xTAE bufferi
- Tag Polimeraz ve solüsyonları
- 10 X PZR buffer
- 25mM MgCl₂
- dNTP
- İmmersiyon yağı
- Elektroforez örnek yükleme solüsyonu(Loading Buffer)
- Agaroz
- Sıvı azot
- GeneMATRIX Tissue & Bacterial DNA Purification Kit

2.11. Kenelerde Tür Tayini

Kenelerin tür tayini Filippova (1977, 1997) ve Apanaskevich ve Horak (2008) tarafından verilen tayin anahtarları kullanılarak Leica MZ16 marka stero mikroskop altında laboratuvarında yapıldı. Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Akaroloji Laboratuvarı'nda Dr. Adem KESKİN tarafından sonuçlar doğrulandı. Teşhisi tamamlanan keneler tekrar *absolute* etil alkol içeren tüplere konularak muhafaza edildi.

2.12. Kenelerden DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu GeneMATRIX Tissue & Bacterial DNA Purification Kit'i kullanılarak gerçekleştirildi.

Kenelerin ezilmesi

Öncelikle keneler ayrı ayrı 1,5 ml'lik eppendorf tüpler içerisine alındı, üzerlerine sıvı azot eklenerek dondurulan keneler pestle yardımıyla un ufak oluncaya kadar ezildi. Parçalanmış kenelerin üzerine 350 µl Lyse T, daha sonra 2 µl RNase A ve 20 µl Proteinase K eklendi.

Vorteksle iyice karıştırılan numuneler eppendorf tüplere uygun inkübatörlerde 60°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Numuneler inkübasyon süresi içerisinde mümkün olduğunca sık aralıklarla vorteksle karıştırıldı.

Ekstraksiyon

Kenelerden DNA ekstraksiyonuna başlarken ilk olarak *DNA binding spin column* içeren tüplere 30 µl Buffer T eklenerek bu tüpler beklemeye alındı.

Diğer taraftan 24 saatlik inkübasyonun sonunda inkübatörden alınan kene örneklerinin üzerine 350 µl Sol T ilave edilerek vortekste karıştırdı ve yeniden 70 °C'de 10 dk boyunca inkübasyona bırakıldı.

Hemen bu aşamada her bir kene örneği için 80 µl olacak şekilde hazırlanan elusyon buffer 80 °C'de 20 dk inkübasyona bırakıldı.

70 °C'de 10 dk inkübasyonun sonunda kene örneklerinin üzerine 350 µl % 96'lık etil alkol eklendi, tüpün içerisinde iyice karışması sağlandı ve daha sonra 12.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlemin sonunda örneklerden 600 µl süpernatant alınarak *DNA binding spin column* içeren toplama tüplerine eklendi ve 11.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda *DNA binding spin column* çıkarılarak tüpte biriken süpernatant döküldü ve yeniden tüpe yerleştirilen *DNA binding spin column* üzerine yine 600 µl süpernatandan eklenip bu işlem bir kez daha tekrarlandı.

Daha sonra *spin column* üzerine önce 500 µl wash TX1 eklenerek, 11.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi, yine tüpte biriken süpernatant döküldü. Daha sonra *spin column* üzerine 500 µl wash TX2 eklenerek tekrar 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Aynı işlem herhangi bir yıkama solüsyonu eklenmeksizin bir kez daha tekrar edildi.

Daha sonra *spin columnlar* üzerine yeni toplama tüplerine yerleştirildi. Her bir tüpün üzerine inkübasyonu tamamlanan elusyon bufferdan 80 µl eklendi ve oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi. Daha sonra 11.000 rpm de 1 dk. santrifüj edildi ve *spin columnlar* çıkarıldı. Bu şekilde elde edilen toplama tüplerindeki DNA'lar analize kadar -20 °C'de buzdolabına kaldırıldı.

Elde edilen DNA'lar TBE X1 tampon ile 4 µl etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve 100 voltaj altında yürütülmüştür. Böylece DNA ekstraksiyon işleminin başarısı kontrol edilmiştir.

2.13. Kandan DNA Ekstraksiyonu

EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinin 2 ml'si DNA ekstraksiyonu için kullanıldı. DNA ekstraksiyonu GeneMATRIX Tissue & Bacterial DNA Purification Kit'i kullanılarak gerçekleştirildi. Ependorf tüpler içine alınan 200 µl kan üzerine 2 µl RNase A ve 20µl Proteinase K eklendi. 200 µl Sol T ilave edilen numuneler vortekste karıştırılıp 60 °C'de 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Numuneler inkübasyon süresi içerisinde mümkün olduğunca sık aralıklarla vortekste karıştırıldı.

Bu sırada *DNA binding spin column* içeren tüplere 30 µl Buffer T eklenerek bu tüpler beklemeye alındı. Hemen bu aşamada her bir kan örneği için 75 µl olacak şekilde hazırlanan elusyon buffer 80 °C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Numunelerin inkübasyonun sonunda üzerlerine 200 µl % 96'lık etil alkol eklendi ve tüpün içerisinde iyice karışması sağlandı. Daha sonra tüpler 12.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlemin sonunda kan örnekleri *DNA binding spin column* içeren toplama tüpü içerisine alındı ve 11.000 rpm de 1 dakika santifüj edildi.

Santrifüj sonunda *DNA binding spin column* çıkarılarak tüpte biriken süpernatant döküldü. Daha sonra spin kolon üzerine önce 500 µl wash TX1 eklenerek, 11.000 rpm de 1 dakika santifüj edildi, yine tüpte biriken süpernatant döküldü. Daha sonra üzerine 500 µl wash TX2 eklenerek tekrar 11.000 rpm de 1 dakika santifüj edildi. Daha sonra *spin columnlar* yeni toplama tüplerine yerleştirildi. Her bir tüpün üzerine inkübasyonu tamamlanan elusyon bufferdan 75 µl eklendi ve oda sıcaklığında birkaç dakika bekletildi ve 11.000 rpm de 1 dakika santifüj edildi ve spin kolonlar çıkarıldı. Bu şekilde izole edilen toplama tüplerindeki DNA'lar analize kadar -20°C buzdolabına kaldırıldı. Şekil 2.4.'de DNA ekstraksiyon aşamasında *DNA binding spin columnların* santrifüj sürecinden bir görüntü verilmiştir.

Elde edilen DNA'lar TBE X1 tampon ile 4 µl etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve 100 voltaj altında yürütülmüştür. Böylece DNA ekstraksiyon işleminin başarısı kontrol edilmiştir.



Şekil 2.4. DNA binding spin columnların santrifüjü

2.14. Moleküler Analiz

Köpekler üzerinden toplanan kenelerde ve köpek kanlarında *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Theileria* spp., *Hemolivia* spp., gibi patojenlerin varlığını araştırmak için kan ve kenelerden elde edilen DNA'lar özel primerler kullanılarak PCR yöntemiyle incelendi.

Rickettsia spp. (Regnery et al. 1991, Fournier et al. 1998, Kato et al. 2013), *Anaplasma* /*Ehrlichia* spp. (Bell and Patel 2005) ve *Babesia* spp. (Casati et al. 2006) primer dizileri ve PCR koşulları Tablo 2.1.'de gösterilmektedir. *Babesia*'nın primerleri protozoonlarda 18S rRNA bölgesini kodlayan DNA bölgesini hedef almaktadır. Bu bölge çok iyi korunduğu için spesifik olup aynı zamanda *Hepatozoon canis*, *Hepatozoon felis*, *Hemolivia mauritanica* ve *Theileria* spp. gibi yakın türleri de çoğaltabilmektedir.

Tablo 2.1. PCR deneylerinde kullanılan Primer dizileri ve PCR koşulları

Patojen	Hedef gen	Primer dizisi	Baz çifti	PCR koşulları	Ref.
<i>Rickettsia</i> spp.	ompA	Rr190.70p ATGGCGAATATTTCTCCAAAA Rr190.602n AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	532	94° 2 dk 94° 30 sn 60° 30 sn 72° 40 sn 72° 6 dk	(Regnery et al. 1991)
<i>Rickettsia</i> spp.	gltA	RpCS.877p GGGGGCCTGCTCACGGCGG RpCS.1258n ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	381	94° 2 dk 94° 30 sn 60° 30 sn 72° 40 sn 72° 6 dk	(Regnery et al. 1991)
<i>Anaplasma</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp.	groEL	ESpF- TACTCAGAGTGCTTCTCAATGT ESpR- GCATACCATCAGTTTTTTCAAC	362	94° 2 dk 95° 45 sn 54° 30 sn 72° 30 sn 72° 6 dk	(Bell and Patel 2005)
<i>Babesia</i> spp. <i>Hepatozoon</i> spp., <i>Theileria</i> spp., <i>Hemolivia</i> spp.	18S rRNA	BJ1- GTCTTGTAATTGGAATGATGG BN2- TAGTTTATGTTAGGACTACG	411-452	94° 2 dk 94 30 sn 56 30 sn 72 40 sn 72° 6 dk	(Casati et al. 2006)

Her bir kan ve kene örneği için hazırlanan PCR bileşenleri Tablo 2.2., 2.3. ve 2.4.'de gösterilmektedir.

Tablo 2. 2. *Rickettsia* spp. için hazırlanan PCR bileşenleri.

PCR bileşenleri (Buffer)	Reaksiyon tüpündeki konsantrasyon
10X PCR tamponu	5 µl
MgCl ₂	3,5 µl
dNTP	0,3 µl
Primer forward	0,3 µl
Primer revers	0,3 µl
Tag DNA Polimeraz	1 µl
Template DNA	2 µl

Son hacim 50 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 2. 3. *Anaplasma* spp. ve *Ehrlichia* spp. için hazırlanan PCR bileşenleri.

PCR bileşenleri	Reaksiyon tüpündeki konsantrasyon
10X PCR tamponu (Buffer)	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP	0,1 µl
Primer forward	1 µl
Primer revers	1 µl
Tag DNA Polimeraz	0,7 µl
Template DNA	5 µl

Son hacim 50 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 2. 4. *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Theileria* spp., *Hemolivia* spp. için hazırlanan PCR bileşenleri.

PCR bileşenleri	Reaksiyon tüpündeki konsantrasyon
10X PCR tamponu (Buffer)	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP	0,3 µl
Primer forward	1 µl
Primer revers	1 µl
Tag DNA Polimeraz	1 µl
Template DNA	3 µl

Son hacim 50 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

2.15. PCR Ürünlerin Saptanması

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin Kary Mullis tarafından 1985 yılında tanımlanmasından sonra nükleik asit amplifikasyon yöntemleri hızla tanı laboratuvarlarına girmiştir. Hızlı sonuç vermesi, konvansiyonel yöntemlerle saptanması zor ya da imkansız mikroorganizmaları saptayabilmesi ve yüksek duyarlılığı nedeniyle klinik mikrobiyoloji alanında önemli bir tanısal yöntem haline gelmiştir. Rutin mikrobiyolojik tanıda PCR yönteminin kullanım amacı, hastalardan alınan örnekler içinde, hastalık etkeni mikroorganizmanın nükleik asitlerinin varlığının saptanmasıdır. PCR yöntemi, nükleik asitlerin

invitro olarak çoğaltılmasını ve böylece yüksek duyarlılıkta saptanmasını sağlayan bir yöntemdir. Bir başka deyişle, canlı bir hücre içinde gerçekleşen DNA replikasyonu, PCR yönteminde bir tüp içinde taklit edilir.

Bu amaçla, bakteri hücresinde DNA replikasyonu için kullanılan enzimlerin işlevleri, farklı sıcaklıklar kullanılarak gerçekleştirilir. Bakteri replikasyonunun başlayabilmesi için ilk basamak, DNA çift zincirlerinin birbirinden ayrılmasıdır. Bakterilerde bu işlem helikaz enzimi tarafından gerçekleştirilirken, PCR yönteminde 94°C gibi yüksek bir ısı uygulanarak, zincirlerin birbirlerinden ayrılması sağlanır. Bakterilerde primaz enzimi ile gerçekleştirilen DNA üzerinde polimerazın bağlanacağı RNA dizisi yerine sentetik olarak oluşturulmuş yaklaşık 20 nükleotit uzunluğunda DNA primer dizileri kullanılır. Bakteriyel replikasyon, uygun çalışma sıcaklığı 37°C olan DNA polimeraz enzimi tarafından yapılırken, PCR yönteminde yüksek sıcaklıklarda çalışabilen *Taq* polimeraz enzimi kullanılır.

Buradan anlaşılacağı gibi PCR'ın gerçekleşmesi için reaksiyon tüpünde aranan mikroorganizmaya özgül primer dizileri, DNA zincir sentezinde kullanılacak nükleotitler (A, G, C, T), nükleotitlerin komplementer bağlanması için bir ko-faktör olan Mg iyonları, *Taq* polimeraz enzimi ve enzimin tamponu bulunmalıdır. Buna ek olarak içinde nükleik asit aranacak örnek de eklenmelidir. In vitro DNA çoğaltması için gerekli sıcaklık kontrolü "thermal cycler" denilen otomatize ısı kontrol cihazlarında gerçekleştirilmektedir.

PCR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. İlk basamak denatürasyondur ve 94°C'ye ısıtılan DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılması söz konusudur. İkinci basamak birleşmedir (annealing). Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları ile bağlanırlar. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 50-70°C arasındadır. Üçüncü basamak polimerizasyon ya da sentez aşamasıdır. Reaksiyon karışımı sıcaklığa dirençli DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklık olan 72°C'ye getirildiğinde, primerlere bağlanan enzim molekülleri dizinin 3' ucuna kalıp DNA'ya uygun nükleotitleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışta iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının birer kopyası çıkartılarak başlangıçtaki DNA miktarı her döngüde geometrik olarak çoğaltılır. Çoğaltılan DNA

parçalarının (amplikon) gösterilmesi için agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yapılır. Elektroforez ile boylarına göre ayrıştırılan DNA dizileri etidyum bromür gibi çift zincirli DNA boyaları ile boyanarak morötesi ışık altında görüntülenir (Real Time PCR kurs notları, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarları, 2012).

PCR ürünlerinin saptanması amacıyla 15 µl PCR ürününün TBE tampon ile hazırlanan %2,2'lik agarozda jel elektroforezi yapıldı (Şekil 2.5.). Ürünler jele yüklenirken ilk kuyucuk markerla (belirteç) işaretlendi. Kuyucuklardan bir tanesine pozitif kontrol yüklenerek PCR sürecinin başarılı olup olmadığı kontrol edildi. "Loading buffer" ile boyanarak jele yüklenen PCR ürünleri etidyum bromür ile işaretli agaroz jelde 117 voltda 55 dakika yürütüldü ve UV translüminatör ile incelendi. PCR ürünlerinin büyüklükleri DNA moleküler belirtecinin bantları ile karşılaştırılarak doğrulandı ve jel görüntüleri dijital fotoğraf makinası ile görüntülendi ve bilgisayar ortamına aktarıldı.

Jel Elektroforez İşleminde Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlama Prosedürleri

Agaroz jel (%2,2) hazırlama

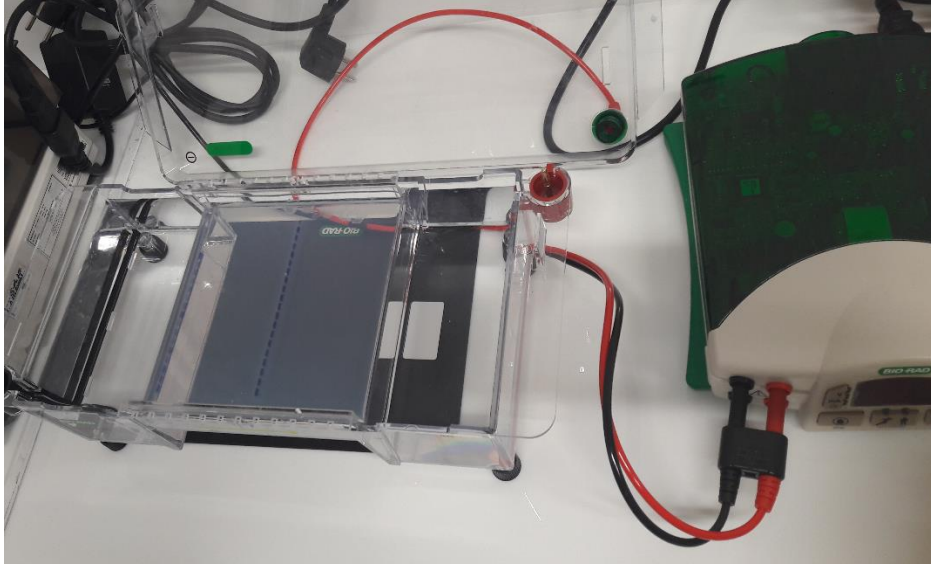
Agar	2,2 g
TBE X 1	100 ml
Etidyum bromür	7 µl

TBE X 5 tamponu hazırlama

TRİS base	54 g
Borik asid	27,5 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	20 ml
dd H ₂ O	980 ml

TBE X 1 tamponu hazırlama

TBE X 5	200 ml
dd H ₂ O	800 ml



Şekil 2.5. Jel elektroforezi

2.16. Kan Yaymalarının İncelenmesi

Boyanan kan frotileri ışık mikroskopunda immersiyon yağı ile 100X'lük büyütmede incelendi. Kan yayma preparatları kandaki şekilli elemanlarının morfolojik olarak incelenmesine olanak sağlar ve birçok hastalığın tanısında önemlidir.

3. SONUÇLAR

3.1. Köpeklerdeki Kene Yoğunluğu

Bu çalışmada kan örneği alınan ve kene taraması yapılan köpeklerin %21.43(15/70)'ü keneler ile enfesteydi. Enfeste bireylerdeki ortalama kene yoğunluğunun 3.6 (1-5) olduğu tespit edildi.

Nisan-Aralık 2018 tarihleri arasında bakım evine rehabilitasyon amacı ile getirilen köpeklerin yaş dağılımları ve kene ile enfeste birey sayıları Tablo 3.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan köpeklerin yaş dağılımı ve keneli birey sayısı

Yaş aralığı	Keneli birey sayısı	Toplam birey sayısı
1-2	-	5
2-3	3	12
3-4	-	16
4-5	4	17
5-6	3	11
6-7	3	6
7-8	2	3

Buna göre en fazla enfestasyona, 4-6 yaş aralığındaki bireylerde rastlandı. 7-8 yaş aralığındaki bireyler arasında enfeste birey sayısı diğer gruplara göre daha düşüktü. 1-2 ve 3-4 yaş aralığındaki bireylerde kene enfestasyonuna rastlanmadı.

3.2. Köpekleri Enfeste Eden Kene Türleri

Nisan-Aralık 2018 tarihleri arasında bakım evine rehabilitasyon amacı ile getirilen köpekler üzerine tutunan kenelerin türlerine ve gelişme evrelerine göre dağılımları Tablo 3.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.2. Köpekler üzerine tutunan kenelerin türlerine ve gelişme evrelerine göre dağılımları

Cinsler	Larva	Nimf	Dişi (♀)	Erkek (♂)	Toplam
<i>Ixodes kaiseri</i>	-	-	3	-	3
<i>Hyalomma</i> spp.	-	7	-	-	7
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	-	-	7	14	21
<i>Haemaphysalis parva</i>	-	-	6	13	19
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	-	-	4	-	4
Toplam	-	7	16	27	53

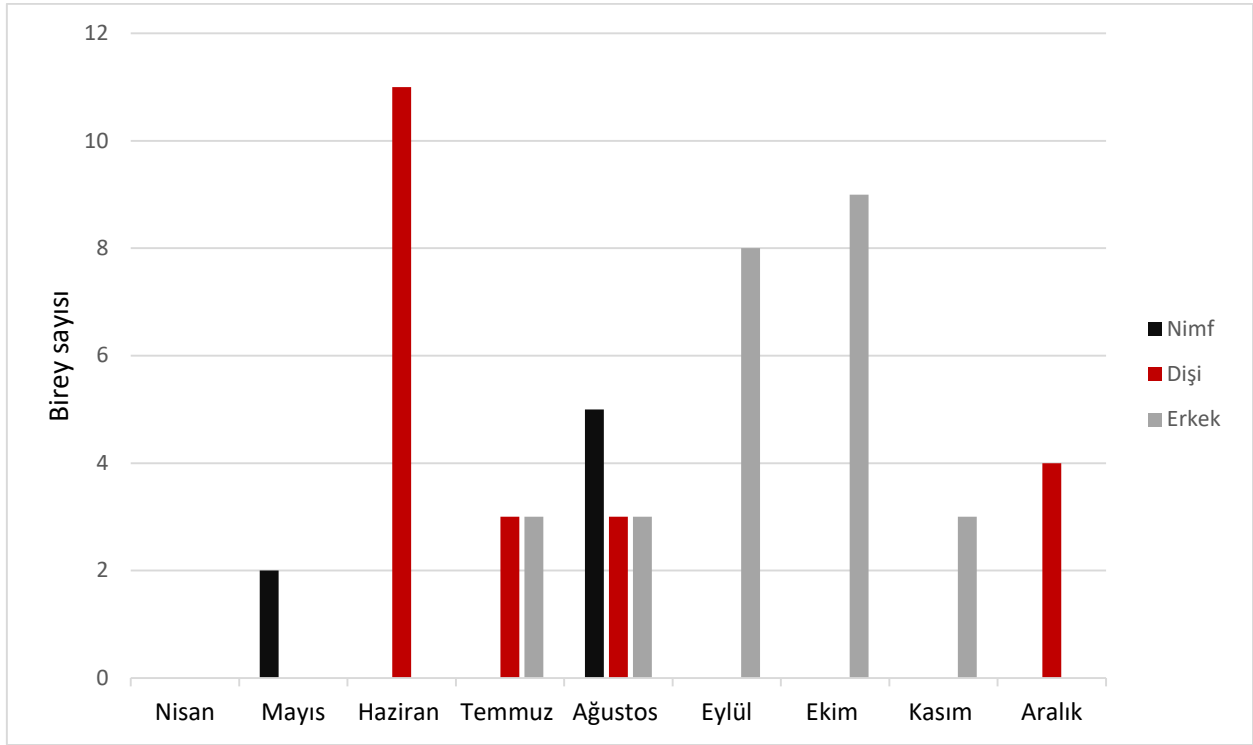
3.3. Kenelerin Aylara Göre Dağılımı

Köpekler üzerinden toplanan kenelerin aylara göre dağılımı Tablo 3.3.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.3. Köpekler üzerine tutunan kenelerin aylara göre dağılımı

Kene Türleri	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık
<i>Ixodes kaiseri</i>	-	-	-	-	3♀	-	-	-	-
<i>Hyalomma</i> spp.	-	2 nimf	-	-	5 nimf	-	-	-	-
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	-	-	4♀	3♀	-	8♂	6♂	-	-
<i>Haemaphysalis parva</i>	-	-	7♀	3♂	3♂	-	3♂	3♂	-
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	4♀
Toplam	-	2 nimf	11♀	3♀, 3♂	3♀, 3♂, 5 nimf	8♂	9♂	3♂	4♀

Buna göre en fazla kene Haziran ve Ağustos ayında, en az kene ise Nisan ve Mayıs aylarında kaydedildi (Şekil 3.1.)



Şekil 3.1. Köpekler üzerine tutunan kenelerin aylara göre dağılımı

3.4. Kenelerde Moleküler Olarak Saptanan Patojenler

Ixodes kaiseri ve *Rhicephalus turanicus* türü kenelerde *Rickettsia* spp. moleküler olarak tespit edilmiştir. *Hyalomma* spp. ve *Rhicephalus turanicus* türü kenelerde *Babesia* spp. moleküler olarak tespit edildi. Köpekler üzerine tutunan kenelerde moleküler olarak tespit edilen patojenler ve bulunma oranları Tablo 3.4.'de gösterilmektedir. Kenelerde *Ehrlichia* spp. ve *Anaplasma* spp. moleküler olarak tespit edilemedi.

Tablo 3.4. Kenelerde bulunan patojenlerin moleküler analizi ile ilgili bulgular

Patojenler	n/%
<i>Rickettsia</i> spp.	6/%11.1
<i>Ehrlichia</i> spp.	0
<i>Anaplasma</i> spp.	0
<i>Babesia</i> spp.	4/%7.4
<i>Theileria</i> spp.	0
<i>Hepatozoon</i> spp.	0
<i>Francisella tularensis</i>	0

3.5. Kan Örneklerinde Moleküler Olarak Saptanan Patojenler

Köpeklerden alınan kanlarda moleküler olarak tespit edilen patojenler ve bulunma oranları Tablo 3.5.'de gösterilmektedir. Kan örneklerinde yalnızca *Babesia* spp. tespit edildi. *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. ve *Rickettsia* spp. kan örneklerinde moleküler olarak tespit edilemedi.

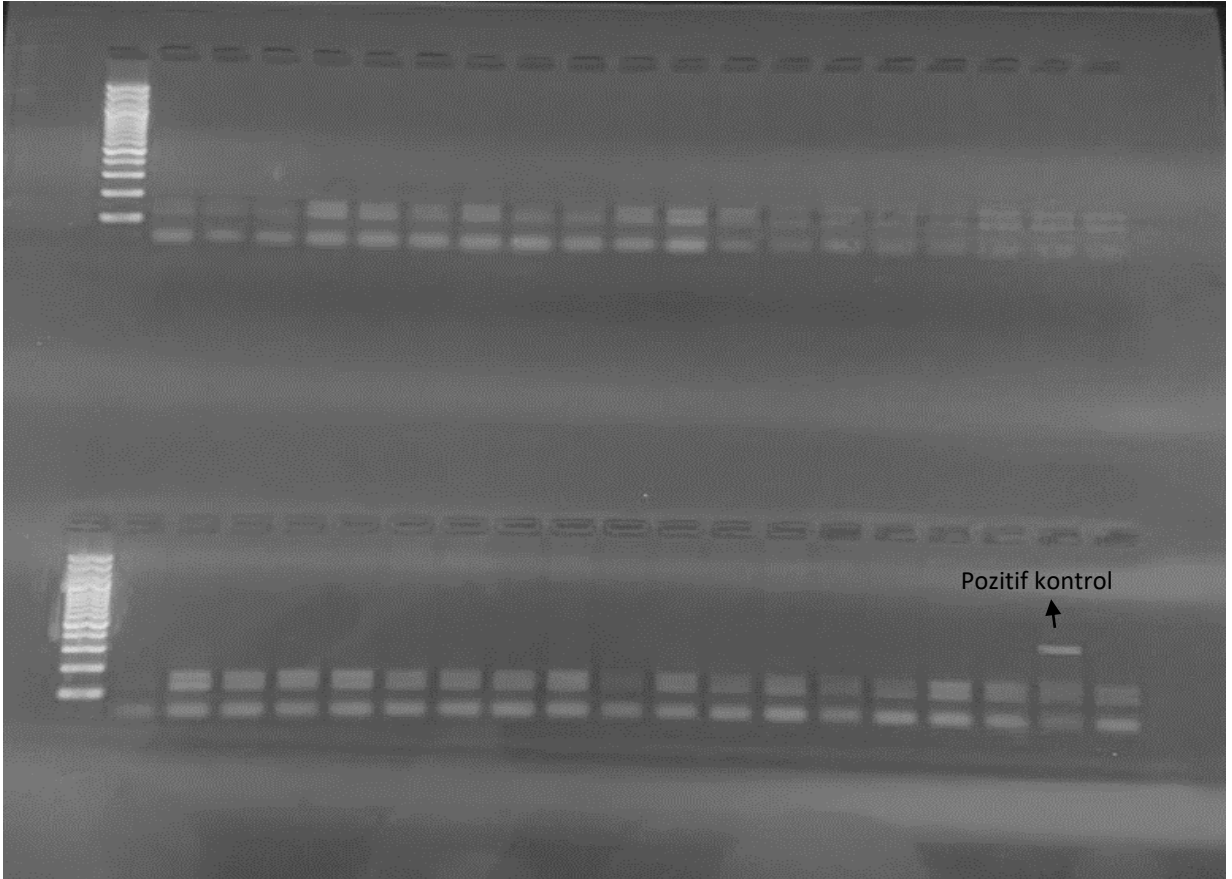
Tablo 3.5. Kanda bulunan patojenlerin moleküler analizi ile ilgili bulgular

Patojenler	n/%
<i>Rickettsia</i> spp.	0
<i>Ehrlichia</i> spp.	0
<i>Anaplasma</i> spp.	0
<i>Babesia</i> spp.	18/%25.7
<i>Theileria</i> spp.	0
<i>Hepatozoon</i> spp.	0
<i>Francisella tularensis</i>	0

3.6. Elektroforez Görüntüleri

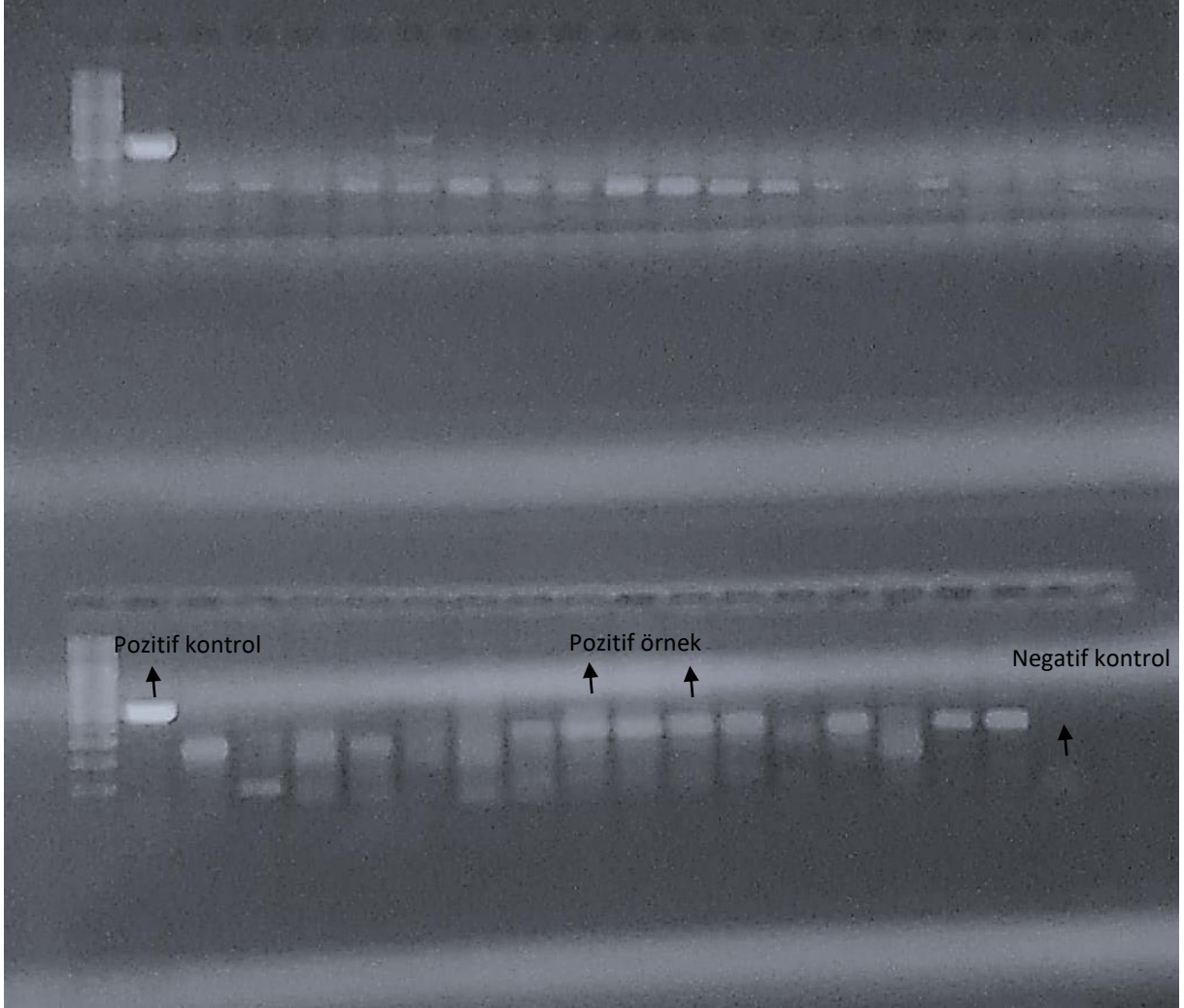
PCR ürünlerinin 15 µl'si yükleme solüsyonu ile birlikte etidyum bromür ile işaretlenmiş %2,2'lik agarozda jel elektroforezi ile yürütüldü. İlk kuyucuklara markerlar yüklendi. PCR ürünlerinin büyüklükleri DNA moleküler belirtecinin bantları ile karşılaştırılarak doğrulandı ve jel görüntüleri dijital fotoğraf makinası ile görüntülenerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

Şekil 3.2.'de *Ehrlichia* spp. ve *Anaplasma* spp. için hazırlanan PCR bileşenlerinin jel elektroforez görüntüleri verilmiştir. Buna göre kan ve kenelerden elde edilen PCR ürünlerinin tamamı bu iki patojen açısından negatiftir.



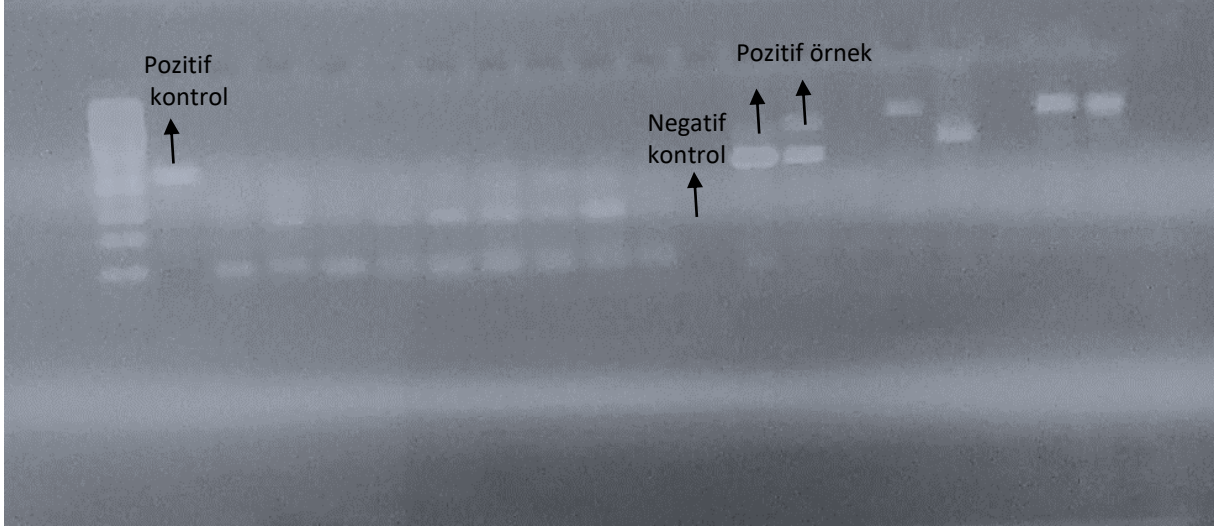
Şekil 3.2. *Ehrlichia* spp. ve *Anaplasma* spp. için hazırlanan PCR ürünlerinin jel görüntüsü

Şekil 3.3.'de *Babesia* spp. için hazırlanan PCR bileşenlerinin jel elektroforezi görüntüleri verilmiştir. Buna göre kenelerin 7.4%'ü ve kan örneklerinin 25.7%'si *Babesia* spp. yönünden pozitif çıkmıştır.



Şekil 3.3. *Babesia* spp. için hazırlanan PCR ürünlerinin jel görüntüsü

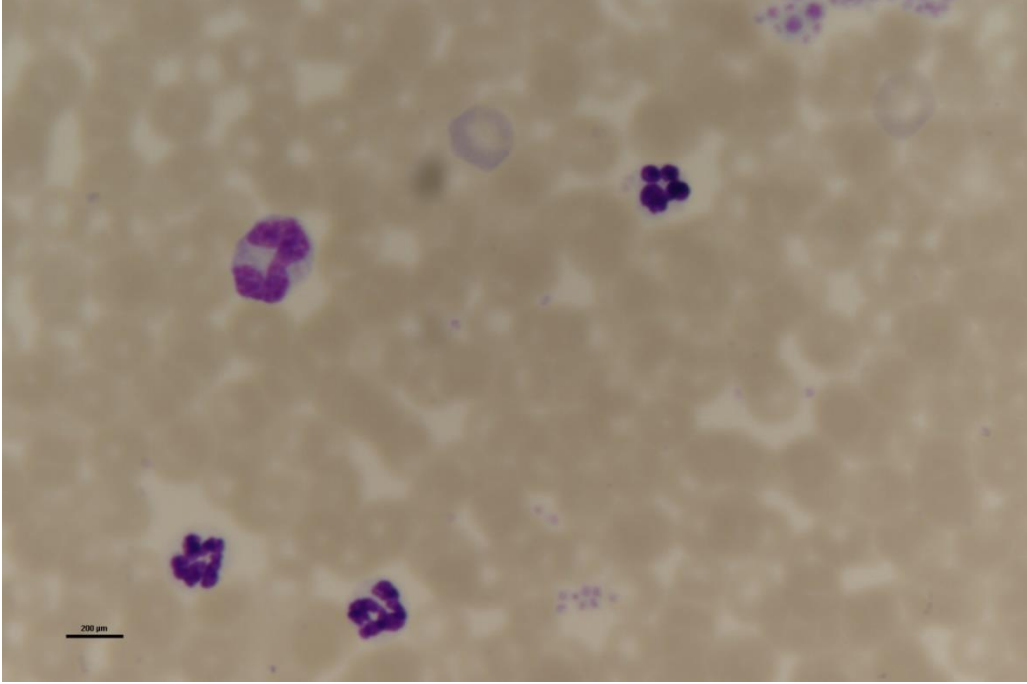
Şekil 3.4.'de *Rickettsia* spp. için hazırlanan PCR bileşenlerinin jel elektroforezi görüntüleri verilmiştir. Buna göre kenelerin 11.1%'i *Rickettsia* spp. yönünden pozitif çıkmıştır.



Şekil 3.4. *Rickettsia* spp. için hazırlanan PCR ürünlerinin jel görüntüsü

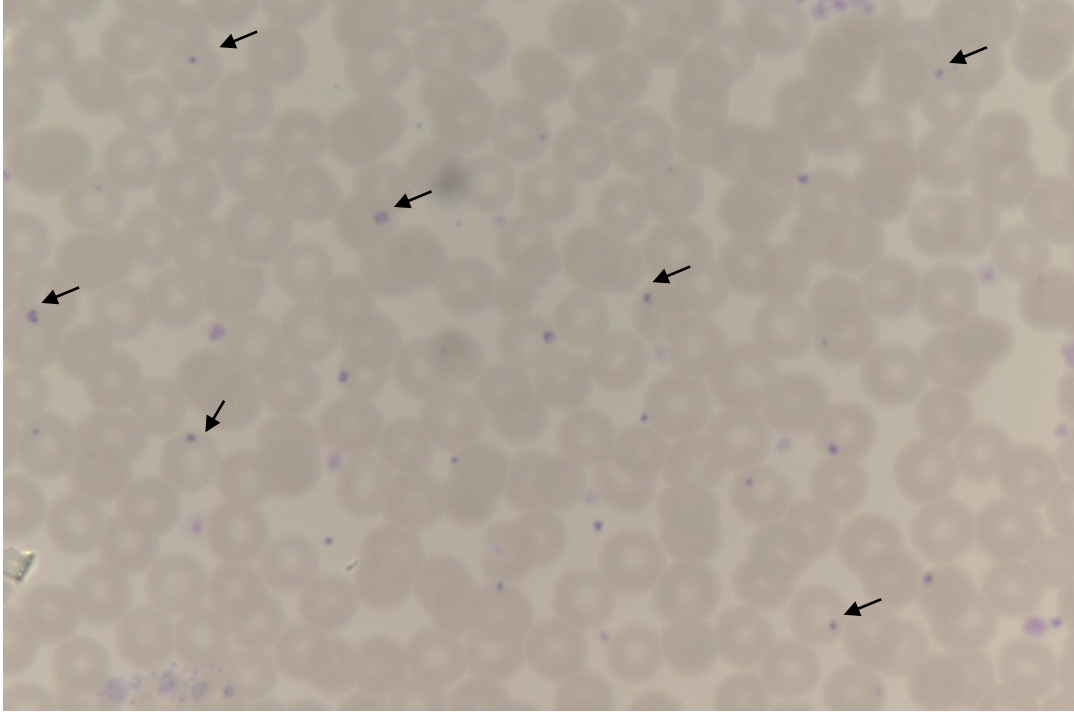
3.7. Kan Yayma Sonuçları

Giemsa boyası ile boyanan kan frotileri ışık mikroskopunda immersiyon yağı ile 100X'lük büyütmede incelendi. Şekil 3.5.'de köpeklere ait kan yaymalarının mikroskobik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3. 5. Kan yaymalarının mikroskobik görüntüsü

Moleküler olarak köpeklerden alınan kan örneklerinin %25.7'si *Babesia* spp. yönünden pozitif bulundu. Ancak mikroskopik olarak her bir köpek için ayrı ayrı hazırlanan kan yaymalarının %22.9'unda *Babesia* spp. ile enfekte kan hücrelerine rastlandı (Şekil 3.6.).



Şekil 3. 6. *Babesia* spp. ile enfekte eritrositlerin mikroskopik görüntüsü

4. TARTIŞMA

Keneler, insan ve hayvanları etkileyen zoonotik hastalıkların önemli vektörüdür; birçok protozoan, bakteriyel ve viral patojenin asıl rezervuarıdır. Keneler, bu patojenlerin dünyadaki yayılımından sorumludur. Kene kaynaklı hastalıklar büyük bir halk sağlığı problemi olarak değerlendirilebileceği gibi, çiftlik hayvanlarının hastalanması ve ölümüne neden olarak büyük ekonomik kayıplara da yol açar (Estrada-Peña and Jongejan 1999, Sparagano et al. 1999).

Rickettsiosis bilinen en eski kene kaynaklı zoonotik hastalıklar arasındadır (Parola et al. 2005). Benekli ateş grubu riketsiosise (Spotted fever group, SFG) *Rickettsia* cinsinden zorunlu hücre içi bakteriler sebep olur (Raoult and Roux 1997, Andoh et al. 2015). Bu bakteriler evcil hayvanlarda, yaban hayvanlarında ve insanlarda hastalık yapabilirler (Parola et al. 2005). Hastalığın klinik bulguları arasında ateş, baş ağrısı, kas ağrısı, döküntü ve lenfadenopati sayılabilir (Raoult and Roux 1997, Parola et al. 2005). Benekli ateş grubu riketsiosisin asıl rezervuarı ve vektörü kenelerdir. Keneler *Rickettsia*yı transstadiyal ve transovaryal olarak geçirebilirler (Socolovschi et al. 2009). Kene kaynaklı riketsiosisin dağılımı enfekte vektör kenelerin dağılımı ile örtüşür (Parola and Raoult 2001). *Rickettsiae* spp. Karasartova ve ark. (2018) tarafından Çorum'da *Hyalomma marginatum* ve *Hae. parva* türü kenelerde daha önce tespit edilmiştir.

Ehrlichiosis'e Anaplasmataceae familyasından Rickettsiales takımından gram negatif zorunlu hücre içi bir bakteri olan *Ehrlichia* neden olur. Ehrlichiosis insanlarda ve evcil hayvanlarda görülen kene kaynaklı enfeksiyon hastalığıdır. Ehrlichial hastalıkların geçişi keneler aracılığıyla olur ve keneler insanları da içeren birçok konağı enfeste eder. *Ehrlichiosis* hayvanların üretkenliğini olumsuz etkiler ve hatta ölümcül olabilir. *Ehrlichia* kenelerin tükrük bezlerinde ve orta bağırsaklarında; omurgalı konaklarının ise kan hücrelerinde veya damar endotelial hücrelerinde bulunur (Hosseini-Vasoukolaei et al. 2014, Jafarbakloo et al. 2014, Lis et al. 2015, Tajedin et al. 2016). Ehrlichiosisin klinik bulguları arasında letarji, ateş, kilo kaybı, lenfadenopati, göz ve burun akıntıları, ekimotik kanamalar ve nörolojik işaretler sayılabilir (Sainz et al. 2015, Derakhshandeh et al. 2017). *Ehrlichia* türleri kan hücreleri içerisinde çoğalır ve enfeksiyonun akut döneminde stoplazma içi mikrokoloniler oluşturabilirler (Kohn et al. 2008, Sainz et al. 2015, Derakhshandeh et al. 2017).

Karasartova ve ark.(2018) tarafından daha önce Çorum İli'nde insanların üzerinden toplanan *H. marginatum*, *Hyalomma* spp., *Haemaphysalis parva* türü kenelerde *Ehrlichia* spp. tespit

edilmiştir. *Ehrlichia* spp., *Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus annulatus* ve *Haemaphysalis sulcata* türü kenelerin yoğun olduğu Giresun, Trabzon, Rize, Tokat, Amasya ve Gümüşhane illerinde doğal büyükbaş hayvan popülasyonunda da tespit edilmiştir (Aktas et al. 2011). İran'da köpekler üzerinden toplanan *Hyalomma asiaticum* ve *Hyalomma anatolicum* türü kenelerde de *Ehrlichia* spp. tespit edilmiştir (Khazeni et al. 2013).

Babesiosis evcil ve yabani hayvanlarda yaygındır ve Ixodidae ailesine bağlı keneler tarafından transovaryal ve transstadiyal olarak taşınır. Hastalık, yüksek ateş, anemi, ikterus, hemoglobüri ile seyrederek ve dünya çapında ekonomik kayıplara neden olur. *Babesiosis*'e *Babesia* enfeksiyonu neden olur. *Babesia* kene kaynaklı, malarya benzeri bir apikompleksa parazittir ve kırmızı kan hücrelerini enfekte eder. Kan frotisine dayanan çalışmalarda *Babesia* türleri İç Anadolu, Doğu Anadolu, Akdeniz, Ege, Karadeniz ve Marmara Bölgeleri'nde tespit edilmiştir (Öncel et al. 2010).

Babesiosis insanlarda da görülebilir ve dünya çapında yeni ortaya çıkan hastalıklar arasında değerlendirilir (Rizzoli et al. 2014). Hastalığın coğrafik dağılımı *Ixodes* spp. türü kenelerin dağılımı ile örtüşür (Hildebrandt et al. 2013). Türkiye'de ilk defa *Babesia microti* geviş getiren hayvanlar üzerinden toplanan *Ixodes ricinus* türü kenelerde tespit edilmiştir (Aydın et al. 2015). *Babesia microti* Sinop bölgesinde insanlarda tespit edilmiştir (Poyraz and Güneş 2010). Karasartova ve ark. (2018) Çorum İli'nde insanlar üzerinden toplanan *Hyalomma marginatum*, *Hyalomma* spp. ve *Rhipicephalus bursa* türü kenelerde *Babesia microti*, *Babesia ovis* ve *Babesia occultans* gibi zoonotik patojenlerin varlığını moleküler tekniklerle gösterdiler.

Bildiğimiz kadarıyla *Ixodes kaiseri* türü keneler, Türkiye'de yalnızca bir kızıl tilkide (*Vulpes vulpes*) kaydedilmiştir (Orkun and Karaer 2018). Köpekler üzerinden toplanan *Ixodes kaiseri* türü keneler Türkiye için ikinci, bölgemiz için yeni bir kayıttır. Üstelik bu keneler *Rickettsia* spp. ile enfektendir.

Rhipicephalus turanicus Akdeniz Bölgesi'nde, Afrika ve Asya'da dağılan, evcil ve yabani hayvanları ve hatta insanları enfeste eden bir kene türüdür (Li et al. 2017). *Rickettsia* spp. gibi kene kaynaklı patojenlerin vektörü olduğu bilinir (Germanakis et al. 2013). Bizim sonuçlarımız bu bilgiyi doğrular niteliktedir. *Rhipicephalus turanicus*'un *Hepatozoan canis*'in vektörleri arasında bir yenisi olduğu ortaya konulmuştur (Giannelli et al. 2017). Karasartova ve ark. (2018) Çorum İli'nde insanlar üzerinden toplanan *Rhipicephalus turanicus* türü kenelerin *Rickettsia*

aeshlimanni ile enfekte olduğunu moleküler olarak ortaya koydular. Yine bizim çalışmamızda *Rhipicephalus turanicus* türü kenelerde *Babesia* spp. moleküler olarak tespit edildi. Daha önce İsrail’de *Rhipicephalus turanicus* türü kenelerde *Babesia canis* tespit edilmiştir (Harrus et al. 2011).

Bizim çalışmamızda nimf *Hyalomma* spp. türü kenelerde *Babesia* spp. moleküler olarak tespit edildi. *Hyalomma* spp. nimf evresinde insanlara özel afinite gösterir (Apanaskevich 2004, Vatansever et al. 2008, Bursali et al. 2010). Karasartova ve ark. (2018) tarafından Çorum İli’nde insanlar üzerinde nimf formda *Babesia* spp. ile enfekte *Hyalomma* spp. kaydedildi. Bu türün insanları da enfeste ediyor olması taşıdığı patojenlerin insanlara da geçebileceğini gösterir. Aslında *Hyalomma* türü keneler *R. aeshlimanni*’nin asıl vektörü olarak bilinir (Beati et al. 1997).

Haemaphysalis parva ve *Rhipicephalus sanguineus* daha önce Yunanistan’da köpekler üzerinde kaydedilmiştir (Latrofa et al. 2017). Yine Çorum İli’nde insanlar üzerinde toplanan kenelerde *Rickettsia* spp. ile enfekte *Haemaphysalis parva* türü keneler kaydedilmiştir (Karasartova et al. 2018).

Türkiye’de ilk Kırım Kongo Kanamalı Ateş(KKKA) hastalığı Tokat İli’nde kaydedildi. Çorum’da yaklaşık 327 Kırım Kongo Vakası kaydedildi. Çorum ve Tokat’ı içine alan Kelkit Vadisi’nde hastalığın asıl vektörünün *Hyalomma marginatum* olduğu bilinmektedir (Inci et al. 2016, Leblebicioglu et al. 2016). Çorum’da insanlarda KKKA hastalığının yanı sıra riketsiosis gibi diğer kene kaynaklı hastalıklar da kaydedilmiştir (Gülanber et al. 2006, Bursali et al. 2012, Gargili et al. 2012, Orkun et al. 2014b, Gureser et al. 2015, Bursali et al. 2017). Çorum’da daha önce insanların üzerinden toplanan kenelerde moleküler yöntemlerle *Rickettsiae* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *B. microti*, *B. occultans*, *B. ovis*, *Hepatozoon* spp., *Theileria* spp. ve *H. mauritanica* tespit edildi (Karasartova et al. 2018). Çorum kene kaynaklı hastalıklar açısından önemli bir bölge olabilir. Dünyada halk sağlığı ve veteriner açıdan önemi olan kene kaynaklı hastalıkların insidansı ve önemi giderek artmaktadır. Moleküler tekniklerle hastalıkların epidemiyolojisi daha iyi anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmada, kene sayısı, kene ve kan örneklerinde tespit edilen patojen mikroorganizma çeşitliliği ve oranı potansiyelin çok altında çıkmıştır. Buna göre Veteriner İşleri Müdürlüğü’nün ektoparazit mücadelesinin başarılı olduğu açıktır.

Veteriner İşleri Müdürlüğü bünyesindeki Veteriner Hekimlerin kontrolünde, besleme odağı olan katı atık tesisinde köpek yoğunluğuna göre ayda bir 150-200 tablet ve bakım evinde 15 günde bir 100 tablet olacak şekilde, tabletler ezilip yemek içine karıştırılarak besleme sırasında köpeklere Dicromec (ivermectin+ praziquantel) oral tablet verilmektedir.

Dicromec Oral Tablet, *Haemonchus sp.*, *Ostertagia sp.*, *Trichostrongylus sp.*, *Strongyloides papillosus*, *Oesophagostomum sp.*, *Cooperia sp.*, *Dictyocaulus sp.*, gibi gastrointestinal nematodların ergin ve larval formları; *Moniezia expansa*, *Stilesia globipunctata*, *Avitellina centripunctata*, *Cycticercus tenuicollis* gibi sestod türlerinin ergin formları; Karaciğer kelebeği (*Dicrocoelium dentriticum*), Burun kurdu (*Oestrus ovis*, *Psoroptes communis ovis*, *Sarcoptes scabiei bovis*), Uyuz etkenleri, kene ve bitlerle mücadelede kullanılan geniş spektrumlu endektosit ve sestosid kombinasyonudur.

Dünya sağlık Örgütü'nün son verilerine göre, insanlarda enfeksiyona neden olan patojenlerin %61' i zoonotik kökenlidir. Bu patojenlerin %75'i son 30 yıl içinde ortaya çıkmıştır. Zoonotik hastalıkların %33'ü hayvanlardan insanlara bulaştıktan sonra, insanlardan insanlara geçebilmektedir. Diğer taraftan, Sağlık Bakanlığının ihbarı mecburi olarak belirlediği 50 hastalıktan yaklaşık %50'si hayvanlardan insanlara bulaşan zoonotik hastalıklardır. Keneler zoonotik hastalıkların bulaşması ve yayılımında oldukça önemli bir role sahiptir.

Özetle insan hekimliği ve veteriner hekimliğin ortak sorunu olan zoonotik hastalıklar, halk sağlığını yakından ilgilendirir. Bu hastalıklar büyük ekonomik zararlara ve iş gücü kayıplarına neden olduğundan ülke ekonomilerini de olumsuz yönde etkilemektedirler. Tek Tıp-Tek Sağlık olgusunun en önemli uğraş alanını zoonotik hastalıklarla savaş oluşturmaktadır.

Keneler ve kene kaynaklı zoonotik hastalıklarla mücadelede, sokak hayvanlarının refahından sorumlu belediyelere de önemli bir görev düştüğü ve Çorum Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü'nün bu konuda oldukça başarılı olduğu açıktır.

5. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın başlangıç aşamasından sonuçlanmasına kadar geçen sürede hiçbir konuda yardımını esirgemeyen, yol gösteren, bize kapılarını açıp huzurlu bir çalışma ortamı sunan Veteriner İşleri Genel Müdürü Sayın Vet. Hek. Mustafa KALIN'a sonsuz teşekkür ederiz.

Vet. Hek. Mert GÜNHAN'a sabrından, büyük emeğinden dolayı çok teşekkür ederiz.

Vet. Hek. Mehmet GÜLTEKİN'e çok teşekkür ederiz.

Başta Murat SAYGIN olmak üzere emeği geçen tüm Veteriner İşleri Genel Müdürlüğü çalışanlarına çok teşekkür ederiz.

6. KAYNAKLAR

- Aktas, M., K. Altay, and N. Dumanli. 2011.** Molecular detection and identification of Anaplasma and Ehrlichia species in cattle from Turkey. *Ticks Tick Borne Dis.* 2: 62-65.
- Andoh, M., A. Sakata, A. Takano, H. Kawabata, H. Fujita, Y. Une, K. Goka, T. Kishimoto, and S. Ando. 2015.** Detection of Rickettsia and Ehrlichia spp. in ticks associated with exotic reptiles and amphibians imported into Japan. *PLoS One* 10: e0133700.
- Apanaskevich, D. 2004.** Host-parasite relationships of the genus Hyalomma Koch, 1844 (Acari, Ixodidae) and their connection with microevolutionary process. *Parazitologiya* 38: 515-523.
- Aydin, M. F., M. Aktas, and N. Dumanli. 2015.** Molecular identification of Theileria and Babesia in ticks collected from sheep and goats in the Black Sea region of Turkey. *Parasitol Res.* 114: 65-69.
- Beati, L., M. Meskini, B. Thiers, and D. Raoult. 1997.** Rickettsia aeschlimannii sp. nov., a new spotted fever group rickettsia associated with Hyalomma marginatum ticks. *Int J Syst Evol Microbiol.* 47: 548-554.
- Bell, C. A., and R. Patel. 2005.** A real-time combined polymerase chain reaction assay for the rapid detection and differentiation of Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia chaffeensis, and Ehrlichia ewingii. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 53: 301-306.
- Bursali, A., A. Keskin, and S. Tekin. 2012.** A review of the ticks (Acari: Ixodida) of Turkey: species diversity, hosts and geographical distribution. *Exp Appl Acarol.* 57: 91-104.
- Bursali, A., S. Tekin, M. Orhan, A. Keskin, and M. Ozkan. 2010.** Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) infesting humans in Tokat Province of Turkey: species diversity and seasonal activity. *J Vector Ecol.* 35: 180-186.
- Bursali, A., A. Keskin, A. Keskin, T. Kul Köprülü, and Ş. Tekin. 2017.** Investigation of the Presence of Rickettsiae in Ticks Parasitizing Humans in Corum Region. *Turk Bulletin of Hyg Exp Bio* 74: 293-298.
- Casati, S., H. Sager, L. Gern, and J. Piffaretti. 2006.** Presence of potentially pathogenic Babesia sp. for human in Ixodes ricinus in Switzerland. *Ann Agric Environ Med.* 13: 65.
- Derakhshandeh, N., H. Sharifiyazdi, and M. A. Hasiri. Year.** Published. Molecular detection of Ehrlichia spp. in blood samples of dogs in southern Iran using polymerase chain reaction, p. 347. *In*, Veterinary Research Forum, 2017. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
- Estrada-Peña, A., and F. Jongejan. 1999.** Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Exp Appl Acarol.* 23: 685-715.
- Fournier, P.-E., V. Roux, and D. Raoult. 1998.** Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Evol Microbiol.* 48: 839-849.
- Gargili, A., A. M. Palomar, K. Midilli, A. Portillo, S. Kar, and J. A. Oteo. 2012.** Rickettsia species in ticks removed from humans in Istanbul, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12: 938-941.
- Germanakis, A., D. Chochlakis, E. Angelakis, Y. Tselentis, and A. Psaroulaki. 2013.** Rickettsia aeschlimannii infection in a man, Greece. *Emerg Infect Dis.* 19: 1176.
- Giannelli, A., R. P. Lia, G. Annoscia, C. Buonavoglia, E. Lorusso, F. Dantas-Torres, G. Baneth, and D. Otranto. 2017.** Rhipicephalus turanicus, a new vector of Hepatozoon canis. *Parasitology* 144: 730-737.

- Gureser, A., O. Akdogan, F. Karadag, D. Yapar, K. Cebi, and N. Baykam. Year.** Published. The epidemiologic features of patients with CCHF infection in an endemic region Corum, Turkey. *In*, 1st International Conference on Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Thessaloniki, Greece, 2015.
- Gülanber, A., A. Gorenflot, T. P. Schetters, and B. Carcy. 2006.** First molecular diagnosis of *Babesia vogeli* in domestic dogs from Turkey. *Vet Parasitol.* 139: 224-230.
- Harrus, S., A. Perlman-Avrahami, K. Mumcuoglu, D. Morick, O. Eyal, and G. Baneth. 2011.** Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, *Candidatus Midichloria mitochondrii* and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. *Clin Microbiol Infect.* 17: 459-463.
- Hildebrandt, A., J. Gray, and K.-P. Hunfeld. 2013.** Human babesiosis in Europe: what clinicians need to know. *Infection* 41: 1057-1072.
- Hosseini-Vasoukolaei, N., M. A. Oshaghi, P. Shayan, H. Vatandoost, F. Babamahmoudi, M. R. Yaghoobi-Ershadi, Z. Telmadarraiy, and F. Mohtarami. 2014.** *Anaplasma* infection in ticks, livestock and human in Ghaemshahr, Mazandaran Province, Iran. *J Arthropod Borne Dis.* 8: 204.
- Inci, A., A. Yildirim, O. Duzlu, M. Doganay, and S. Aksoy. 2016.** Tick-borne diseases in Turkey: A review based on one health perspective. *PLoS Negl Trop Dis.* 10: e0005021.
- Jafarbakloo, A., H. Bakhshi, F. Faghihi, Z. Telmadarraiy, A. Khazeni, M. A. Oshaghi, M. R. Ramzgouyan, and M. M. Sedaghat. 2014.** Molecular detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* infection in ticks in borderline of Iran-Afghanistan. *J Biomed Sci Eng.* 7: 919.
- Kar, S., N. Yilmazer, K. Midilli, S. Ergin, H. Alp, and A. Gargili. 2011.** Presence of the zoonotic *Borrelia burgdorferi* sl. and *Rickettsia* spp. in the ticks from wild tortoises and hedgehogs. *Clin Exp Health Sci.* 1: 166.
- Karaer, Z., E. Guven, S. Nalbantoglu, S. Kar, O. Orkun, K. Ekdal, A. Kocak, and A. Akcay. 2011.** Ticks on humans in Ankara, Turkey. *Exp Appl Acarol.* 54: 85-91.
- Karasartova, D., A. S. Gureser, T. Gokce, B. Celebi, D. Yapar, A. Keskin, S. Celik, Y. Ece, A. K. Erenler, and S. Usluca. 2018.** Bacterial and protozoal pathogens found in ticks collected from humans in Corum province of Turkey. *PLoS Negl Trop Dis.* 12: e0006395.
- Kato, C. Y., I. H. Chung, L. K. Robinson, A. L. Austin, G. A. Dasch, and R. F. Massung. 2013.** Assessment of real-time PCR assay for detection of *Rickettsia* spp. and *Rickettsia rickettsii* in banked clinical samples. *J Clin Microbiol.* 51: 314-317.
- Keskin, A., A. Keskin, A. Bursali, and S. Tekin. 2015.** Ticks (Acari: Ixodida) parasitizing humans in Corum and Yozgat provinces, Turkey. *Exp Appl Acarol.* 67: 607-616.
- Khazeni, A., Z. Telmadarraiy, M. A. Oshaghi, M. Mohebbali, Z. Zarei, and S. M. Abtahi. 2013.** Molecular detection of *Ehrlichia canis* in ticks population collected on dogs in Meshkin-Shahr, Ardebil Province, Iran. *J Biomed Sci Eng.* 6: 1.
- Kohn, B., D. Galke, P. Beelitz, and K. Pfister. 2008.** Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med.* 22: 1289-1295.
- Latrofa, M. S., A. Angelou, A. Giannelli, G. Annoscia, S. Ravagnan, F. Dantas-Torres, G. Capelli, L. Halos, F. Beugnet, and E. Papadopoulos. 2017.** Ticks and associated pathogens in dogs from Greece. *Parasit Vectors.* 10: 301.
- Leblebicioglu, H., R. Ozaras, H. Irmak, and I. Sencan. 2016.** Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: Current status and future challenges. *Antiviral Res.* 126: 21-34.
- Li, H.-Y., S.-S. Zhao, S. Hornok, R. Farkas, L.-P. Guo, C.-F. Chen, R.-F. Shao, J.-Z. Lv, and Y.-Z. Wang. 2017.** Morphological and molecular divergence of *Rhipicephalus turanicus* tick from Albania and China. *Exp Appl Acarol.* 73: 493-499.

- Lis, K., I. G. F. de Mera, M. Popara, A. Cabezas-Cruz, N. Ayllón, E. Zwegarth, L. M. Passos, M. Broniszewska, M. Villar, and K. M. Kocan. 2015.** Molecular and immunological characterization of three strains of *Anaplasma marginale* grown in cultured tick cells. *Ticks Tick Borne Dis.* 6: 522-529.
- Mullen, G. R., and L. A. Durden. 2009.** *Medical and veterinary entomology*, Academic press.
- Orkun, Ö., and Z. Karaer. 2018.** First record of the tick *Ixodes (Pholeoixodes) kaiseri* in Turkey. *Exp Appl Acarol.* 74: 201-205.
- Orkun, Ö., Z. Karaer, A. Çakmak, and S. Nalbantoğlu. 2014a.** Spotted fever group rickettsiae in ticks in Turkey. *Ticks Tick Borne Dis.* 5: 213-218.
- Orkun, Ö., Z. Karaer, A. Çakmak, and S. Nalbantoğlu. 2014b.** Identification of tick-borne pathogens in ticks feeding on humans in Turkey. *PLoS Negl Trop Dis.* 8: e3067.
- Öncel, T., G. Vural, Z. Karaer, A. Çakmak, S. Yurtalan, İ. Öz, Z. N. Erhan, and A. Beyazıt. 2010.** Türkiye’de siğirlarda *Babesia Bovis* ve *B. bigemina*’nın Seroprevelansı.
- Parola, P., and D. Raoult. 2001.** Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis.* 32: 897-928.
- Parola, P., C. D. Paddock, and D. Raoult. 2005.** Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev.* 18: 719-756.
- Poyraz, O., and T. Güneş. 2010.** Seroprevalance of *Babesia microti* in humans living in rural areas of the Sinop region. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 34: 81-85.
- Raoult, D., and V. Roux. 1997.** Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 10: 694-719.
- Regnery, R. L., C. L. Spruill, and B. Plikaytis. 1991.** Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol.* 173: 1576-1589.
- Rizzoli, A., C. Silaghi, A. Obiegala, I. Rudolf, Z. Hubálek, G. Földvári, O. Plantard, M. Vayssier-Taussat, S. Bonnet, and E. Špitalská. 2014.** *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Front Public Health.* 2: 251.
- Sainz, Á., X. Roura, G. Miró, A. Estrada-Peña, B. Kohn, S. Harrus, and L. Solano-Gallego. 2015.** Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors.* 8: 75.
- Socolovschi, C., O. Mediannikov, D. Raoult, and P. Parola. 2009.** The relationship between spotted fever group Rickettsiae and ixodid ticks. *Vet Res.* 40: 1-20.
- Sparagano, O., M. Allsopp, R. Mank, S. Rijpkema, J. Figueroa, and F. Jongejan. 1999.** Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): a review. *Exp Appl Acarol.* 23: 929-960.
- Tajedin, L., H. Bakhshi, F. Faghihi, and Z. Telmadarraiy. 2016.** High infection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* spp. among tick species collected from different geographical locations of Iran. *Asian Pac J Trop Dis.* 6: 787-792.
- Vatansever, Z., A. Gargili, N. Aysul, G. Sengoz, and A. Estrada-Peña. 2008.** Ticks biting humans in the urban area of Istanbul. *Parasitol Res.* 102: 551-553.