

Sivas Yöresinde Koyun Keçi ve Kenelerde *Theileria* ve *Babesia* Türlerinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

Kürşat ALTAY^{1,2,*} Ahmet Duran ATAŞ¹ Erkan ÖZKAN¹

¹Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji AD, Sivas, TÜRKİYE

²Kırgızistan-Türkiye Manas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji AD, Bişkek, KIRGIZISTAN

Özet: Bu çalışmada, Sivas yöresinde (Merkez, Kangal, Koyulhisar ve Yıldızeli) mikroskopik muayene ve reverse line blotting (RLB) metodu ile koyun, keçi ve kenelerde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin varlığı ve yaygınlığı araştırılmıştır. Toplam 309 hayvandan (206 koyun, 103 keçi), DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere EDTA'lı kan örneği alınmış ve mikroskopik muayene amacıyla kan frotileri hazırlanmıştır. Koyun ve keçiler üzerinden toplam 478 kene örneği toplanmıştır. 309 kan ve 27 kene havuzundan elde edilen DNA örnekleri RLB ile *Theileria* ve *Babesia* türleri yönünde analiz edilmiştir. Kan frotilerinin mikroskopik muayenesi sonucunda toplam 8 hayvanda (% 2,59) *Theileria* spp. piroplazmaları belirlenmiştir. RLB sonucuna göre Sivas yöresinde koyun, keçi ve kenelerde *Theileria ovis*, *Theileria* sp. MK, *Theileria* sp. OT3 ve *Babesia ovis*'in varlığı ortaya konulmuştur. RLB ile incelen koyunlarda *T. ovis* pozitiflik oranı % 56,80, keçilerde bu oran % 3,88 toplamda ise % 39,16 olarak bulunmuştur. *Theileria* sp. OT3 pozitiflik oranı koyunlarda % 4,85, toplam hayvanlarda % 3,24 bulunurken, *Theileria* sp. MK pozitiflik oranı koyunlarda % 3,88 ve toplam hayvanlarda % 2,59 olarak belirlenmiştir. Her bir tür ya da genotipi temsilen seçilen birer örneğin 18S SSU rRNA geni V4 çok değişken bölgesinin DNA dizilimi belirlenmiştir. Bu dizilimler GenBank'a sunularak KF266694, KF266695, KF434321 ve KF440691 numaraları alınmıştır. Kene türlerinin *Rhipicephalus bursa*, *Haemaphysalis sulcata*, *Hyalomma marginatum*, *H. detritum* ve *Dermacentor marginatus* olduğu belirlenmiştir. Kene havuzlarının RLB sonucuna göre, *T. ovis* *R. bursa*, *H. marginatum*, *H. detritum* ve *Hae. sulcata*, *B. ovis* ise *R. bursa* havuzlarında tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Theileria*, *Babesia*, koyun, keçi, kene, RLB, Sivas

Molecular Survey of *Theileria* and *Babesia* Species in Small Ruminants and Ticks from Sivas Region of Turkey

Abstract: This study was carried out to investigate the presence and distribution of *Theileria* and *Babesia* species with microscopic examination and reverse line blotting (RLB) techniques in sheep, goats and ticks from Sivas (Sivas, Kangal, Koyulhisar, Yıldızeli) of Central Anatolia region of Turkey. For this purpose 309 blood samples (206 sheep and 103 goats) and 478 tick samples that divided into 27 pools as the species were collected from sheep and goats. The total genomic DNAs were extracted from 309 blood samples and 27 tick pools were tested by RLB for *Theileria* and *Babesia* species. A total of 8 animals (2.59 %) were found to be positive for *Theileria* spp. piroplasms in microscopic examination of the smears. Four species or genotypes (*Theileria ovis*, *Theileria* sp. MK, *Theileria* sp. OT3, *Babesia ovis*) were detected in sheep, goats and ticks pools with RLB. 18S SSU Infection rate of *T. ovis* was 56.80 % in sheep, 3.88 % in goats and totally 39.16 %. *Theileria* sp. OT3 was detected in 4.85 % of sheep and 3.24 % of all animals, while *Theileria* sp. MK was detected 3.88 % in sheep and 2.59 % in all animals. rRNA gene sequences were detected for all species or genotypes. The sequences were submitted to GenBank under accession numbers; KF266694, KF266695, KF434321 and KF440691. The tick species were identified as *Rhipicephalus bursa*, *Haemaphysalis sulcata*, *Hyalomma marginatum*, *H. detritum* and *Dermacentor marginatus*. According to the result of tick pools analysed by RLB, *T. ovis* were detected in *R. bursa*, *H. marginatum*, *H. detritum* and *Hae. sulcata* while *B. ovis* were determined in *R. bursa*.
Keywords: *Theileria*, *Babesia*, sheep, goat, tick, RLB, Sivas

*Sorumlu Yazar: Kürşat Altay

Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Sivas, TÜRKİYE

Kırgızistan-Türkiye Manas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Bişkek, KIRGIZISTAN

e-mail: altayvet@hotmail.com, phone: 00 996 707 73 74

GİRİŞ

Theileriosis ve babesiosis evcil ve yabani hayvanların kenelerle nakledilen protozoar hastalıkları olup, tüm dünyada çiftlik hayvanlarında önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Koyun ve keçilerde theileriosise, *Theileria lestoquardi*, *T. ovis*, *T. separata* ve yeni tespit edilen *T. uilenbergi* ve *T. luwenshuni*'nin neden olduğu, bu türlerden, *T. lestoquardi*, *T. uilenbergi* ve *T. luwenshuni*'nin sığırlardaki *T. parva* ve *T. annulata* gibi yüksek morbidite ve mortaliteyle seyreden klinik, *T. ovis* ve *T. seperata*'nın ise subklinik enfeksiyonlar oluşturduğu ifade edilmiştir. Koyun ve keçilerde enfeksiyona neden olan *Babesia* türleri ise *B. ovis*, *B. motasi* ve *B. crassa*'dır. Bunlardan *B. ovis* ve *B. motasi* patojen türler olup klinik enfeksiyonlardan sorumlu tutulurken *B. crassa* apatojen tür olarak kabul edilmektedir (1-7). *Theileria* sp. OT1, *Theileria* sp. OT3 ile *Theileria* sp. MK'nın patojeniteleri hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır (8,9).

Theileria ve *Babesia* enfeksiyonlarına uygun kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde, hastalığa neden olan türlerin identifikasyonu ve özellikle popülasyon içinde portör hayvanların insidensinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kan parazitlerinin özellikle taşıyıcı hayvanlarda belirlenmesinde kullanılan en yaygın moleküler metot olmuştur. Diğer taraftan, tür spesifik proplar ile hedef DNA'nın bir membranda hibridizasyonu prensibi ile çalışan ve çok sayıda türün eş zamanlı teşhisini mümkün kılan reverse line blot (RLB) metodu da kan parazitlerinin identifikasyonu çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (8-20).

Sivas yöresi iklim ve bitki örtüsü bakımından İxodid kenelerin biyolojik aktivitelerini sürdürmelerine elverişlidir. Enfeksiyonu nakleden kene türünün bilinmesi hastalığa karşı etkili kontrol stratejilerinin geliştirilmesi bakımından önem taşımakta olup, son yıllarda moleküler metotlar kenelerdeki enfeksiyonların belirlenmesinde de kullanılmaktadır (12,21-23). Bu çalışmada, Sivas yöresinde koyun, keçi ve kenelerde bulunan *Theileria* ve *Babesia* türlerinin moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada kullanılacak kan ve kene örnekleri, Nisan-Eylül 2012 yılında, Sivas Merkez, Kangal, Koyulhisar ve Yıldızeli ilçeleri ile bu odaklara bağlı köylerden toplanmıştır. Büyüklükleri 20-250 baş arasında değişen sürülerdeki, en az bir hastalık sezonu geçirmiş koyun ve keçilerden EDTA (di-sodium ethylenediaminetetra-acetic acid)'lı tüplere yaklaşık 3 ml kan örneği alınmıştır (Tablo 1). EDTA'lı kanlardan mikroskopik muayene amacıyla sürme frotiler hazırlanmıştır. Kan örnekleri, +4 °C'yi sağlayan termos içerisinde Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilerek, DNA ekstraksiyonunda kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 1. Sivas yöresinde kan örneği toplanan koyun ve keçi sayıları

Odak	Koyun	Keçi	Toplam
Sivas Merkez	48	27	75
Kangal	40	21	61
Koyulhisar	68	12	80
Yıdizeli	50	43	93
Toplam	206	103	309

Çalışma süresince kan örneği alınan koyun ve keçilerin tamamı kene enfestasyonu yönünden muayene edilmiştir. Toplanan keneler plastik tüpler içerisinde laboratuvara getirilerek, stereo mikroskop altında tür identifikasyonları yapıldıktan sonra DNA ekstraksiyonunda kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Toplam 478 erişkin İxodid kene toplanmıştır. Kenelerin tür tayinleri, stereo-mikroskop altında, morfolojik özelliklerine göre yapılmıştır (24,25).

Kan Frotilerinin Mikroskopik Muayenesi

Koyun ve keçilerden alınan, EDTA'lı kanlardan saha çalışması esnasında frotiler hazırlanmıştır. Giemsa yöntemi ile boyanan frotiler, 100'lük objektifte *Theileria* ve *Babesia* spp. piroplasm formları yönünden incelenmiştir. Mikroskopik muayenede en az 100 mikroskop sahası incelenmiş ve bir etkenin görülmesi durumunda frotiler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

DNA Ekstraksiyonu

Sivas yöresindeki koyun ve keçilerden alınan ve laboratuvarında -20° de muhafaza edilen EDTA'lı kan örneklerinden total DNA ekstraksiyonu, ticari DNA izolasyon kiti ile yapılmıştır (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Fermentas, K0722). DNA ekstraksiyonunda 200 µl EDTA'lı kan kullanılmıştır.

Koyun ve keçiler üzerinden toplanan ve tür identifikasyonları yapıldıktan sonra % 70'lik alkolde muhafaza edilen kenelerden DNA ekstraksiyonu türlere göre kene havuzları oluşturularak yapılmıştır. Toplam 254 adet kene, her havuzda 1-20 adet kene içerecek şekilde 27 havuza ayrılmıştır. Kene örneklerinde DNA ekstraksiyonu ticari izolasyon kiti (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, 69506) kullanılarak yapılmıştır. Örneklerin 56°C'de Proteinaz K ile inkübasyon basamağı bir gece (overnight) uygulanmıştır.

Kan ve kenelerden elde edilen DNA örnekleri polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Reverse Line Blotting (RLB) ve Sekans Analizi

Reverse Line Blotting'de kullanılma üzere, PZR'unda RLB-F2 ve RLB-R2 (Thermo Scientific, Almanya) primerleri kullanılarak *Theileria* ve *Babesia* türlerinin 18S small subunit ribosomal RNA geninin V4 değişken bölgesinin 360-430 bp'lik kısmı amplifiye edilmiştir (26) (Tablo 2).

Polimeraz zincir reaksiyonunda elde edilen PZR ürünlerinin 40 µl'si RLB'de *Theileria* ve *Babesia* tür spesifik problemlere (Tablo 2) karşı hibridizasyona tabi tutulmuştur. RLB testinde kullanılacak türe özgü problemler 5' – uçlarında amino grubu N – (Trifluorasetamidohexyl – eyanoethyl, N, N, - diisopropyl phosporamidite (TFA)-C6 aminolinker) içerecek şekilde Thermo

Scientific (Almanya) firmasına sentezlettirilmiştir. Reverse line blotting, Altay ve ark., (8) ile Gubbels ve ark., (17)'na uygun olarak yapılmıştır.

Tablo 2. Reverse line blotting testinde kullanılan primer ve prob dizimleri

	Sekans dizilimi (5'-3')	Kaynak
Primer		
RLB-F2	GACACAGGGAGGTAGTGACAAG	26
RLB-R2	biotin-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT	26
Prop		
Catchall	Amino-TAATGGTTAATAGGA(AG)C(AG)GTTG	17
<i>Theileria</i> spp.	Amino-TGATGGGAATTTAAACC(CT)CTTCCA	9
<i>Theileria</i> sp. OT1	Amino-ATC TTC TTT TTG ATG AGT TGG TGT	9
<i>T. ovis</i>	Amino-TTTTGCTCCTTTACGAGTCTTTGC	9
<i>Theileria</i> sp. OT3	Amino-ATTTTCTCTTTTATATGAGTTTT	9
<i>T. lestoquardi</i>	Amino-ATTGCTTGTGTCCCTCCG	19
<i>Theileria</i> sp. MK	Amino-CATTGTTTCTTCTCATGTC	8
<i>Theileria</i> sp. China 1	Amino-TCGGATGATACTTGTATTATC	19
<i>Theileria</i> sp. China 2	Amino-TGCATTTTCCGAGTGTTACT	19
<i>Babesia</i> spp.	Amino-CCT(GT)GGTAATGGTTAATAGGAA	19
<i>B. ovis</i>	Amino-GCGCGCGGCCTTTGCGTTACT	9
<i>B. motasi</i>	Amino-ATTGGAGTATTGCGCTTGCTTTTT	9
<i>B. crassa</i>	Amino-TTA TGG CCC GTT GGC TTA T	19

Kan ve kene örneklerinin RLB testi ile analizinde tespit edilen *Theileria* ve *Babesia* tür ya da genotiplerinin 18S SSU rRNA geni çok değişken bölgesi sekanslanarak DNA dizilimi belirlenmiştir (İontek, Türkiye). Bu çalışmada belirlenen DNA dizimleri, daha önce GenBankasına kaydı yapılmış DNA dizimleri ile BLAST analizi yapılarak karşılaştırıldıktan sonra GenBank'a (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank>) sunularak accession number'ları alınmıştır.

BULGULAR**Mikroskopik muayene**

Sivas yöresinde *Theileria* spp. ve *Babesia* spp. yönünden mikroskopik muayene ile incelenen 309 koyun ve keçinin 8'inde (% 2,59) *Theileria* spp. piroplazmalarına rastlanmıştır. Hiç bir örnekte *Babesia* spp. tespit edilememiştir. *Theileria* spp. piroplazmaları tespit edilen koyun oranı % 3,88 (8/206) bulunmuş, keçilerin kan frotilerinde etkene rastlanmamıştır.

Reverse Line Blotting Analizi

Koyun ve keçi kanlarının RLB analiz sonuçları Tablo 3'de verilmiştir. İncelenen hayvanların en az bir tür ile enfekte olanlarının oranı % 41,42 (128/309) olarak bulunmuştur. Bu oran koyunlarda % 60,19 (124/206), keçilerde % 3,88 (4/103)'dir. Sivas yöresinde koyun ve keçilerde en yaygın türün *T. ovis* olduğu (% 39,16), *T. ovis* pozitifliğinin koyunlarda % 56,80 (117/206), keçilerde % 3,88 (4/103), *Theileria* sp. MK pozitifliğinin ise koyun ve keçilerde % 2,58 (8/306), sadece koyunlarda ise % 3,88 (8/206) olduğu tespit edilmiştir. *Theileria* sp. OT3 pozitifliğinin ise koyun ve keçilerde % 3,24 (10/309), sadece koyunlarda % 4,85 (10/206) olarak belirlenmiştir. Keçilerde *Theileria* sp. MK ve *Theileria* sp. OT3 tespit edilememiştir. Tek türle enfeksiyon oranları incelendiğinde, *T. ovis* pozitifliği toplamda % 35,60 (110/309), koyunlarda % 51,46 (106/206), keçilerde % 3,88 (4/103); *Theileria* sp. OT3 pozitifliği toplamda % 1,94 (6/309), koyunlarda % 2,91 (6/206); *Theileria* sp. MK pozitifliği toplamda % 0,32 (1/309), koyunlarda % 0,48 (1/206) olarak tespit edilmiştir. *T. ovis* ve *Theileria* sp. OT3'ün neden olduğu miks enfeksiyon oranının toplamda %1,29 (4/309), koyunlarda 1,94 (4/206); *T. ovis* ve *Theileria* MK'nın neden olduğu miks enfeksiyon oranının toplamda % 2,26 (7/309), koyunlarda % 3,39 (7/206) olduğu ortaya çıkmıştır.

Tablo 3. Sivas yöresinde *Theileria* ve *Babesia* türleri yönünden incelenen koyun ve keçilerin mikroskopik muayene ve reverse line blotting sonuçları

	Mikroskopik muayene		Reverse line blotting							
	<i>Theileri a spp.</i> (%)	<i>Babesi a spp.</i> (%)	Toplam enfeksiyon oranı (%)			Tek enfeksiyon oranı (%)			Miks enfeksiyon oranı (%)	
			<i>T. ovis</i>	<i>Theileri a sp.</i> OT3	<i>Theileri a sp.</i> MK	<i>T. ovis</i>	<i>Theileri a sp.</i> OT3	<i>Theileri a sp.</i> MK	<i>T. ovis</i> + <i>Theileri a sp.</i> OT3	<i>T. ovis</i> + <i>Theileri a sp.</i> MK
Koyun	8 (3,88)	0	117 (56,80)	10 (4,85)	8 (3,88)	106 (51,46)	6 (2,91)	1 (0,48)	4 (1,94)	7 (3,39)
Keçi	0	0	4 (3,88)	0	0	4 (3,88)	0	0	0	0
Toplam	8 (2,59)	0	121 (39,16)	10 (3,24)	8 (2,59)	110 (35,60)	6 (1,94)	1 (0,32)	4 (1,29)	7 (2,26)

Çalışma süresince toplanan 478 adet erişkin İxodid kene; *Rhipicephalus bursa* (376), *Haemaphysalis sulcata* (56), *Hyalomma marginatum* (39), *Hyalomma detritum* (6) ve *Dermacentor marginatus* olarak tanımlanmıştır. Koyun ve keçilerden toplanan kene örneklerinden oluşturulan havuzlara ait; kene türü, sayısı ve RLB sonuçları Tablo 4’de verilmiştir. Buna göre 27 kene havuzunun 10’unda *T. ovis*, 2’sinde *B. ovis* pozitif sonuç alınmıştır. Sonuçların kene türlerine göre dağılımına bakıldığında; 12 *R. bursa* havuzunun 6’sında *T. ovis*, 2’sinde *B. ovis*; 8 *H. marginatum* havuzunun 1’inde *T. ovis*; 5 *Hae. sulcata* havuzunun 2’sinde *T. ovis* ve tek olan *H. detritum* havuzunda *T. ovis* pozitif sonuç alınmıştır.

Tablo 4. *Theileria* ve *Babesia* türleri yönünden analiz edilen kene havuzları ve RLB sonuçları

Kene türü	Kene sayısı	Havuz sayısı	RLB sonucu	
			<i>T. ovis</i>	<i>B. ovis</i>
<i>R. bursa</i>	171	12	6	2
<i>H. marginatum</i>	34	8	1	-
<i>H. detritum</i>	5	1	1	-
<i>Hae. sulcata</i>	43	5	2	-
<i>D. marginatus</i>	1	1	-	-
Toplam	254	27	10	2

18S SSU rRNA Geni DNA Dizi Analizi

Bu çalışmada koyun, keçi ve kenelerden tanımlanmış *Theileria* (*T. ovis*, *Theileria sp. MK* ve *Theileria sp. OT3*) ve *Babesia* (*B. ovis*) türlerinin 18S SSU rRNA geni kısmi olarak sekanslanmıştır. Bu sekanslar, GenBank’ta mevcut diğer *Theileria* ve *Babesia* sekansları ile karşılaştırıldığında, *T. ovis*, *Theileria sp. MK*, *Theileria sp. OT3* ve *B. ovis*’in *T. ovis* (JQ373135), *Theileria sp. MK* (EF0922456), *Theileria sp. OT3* (DQ866840) ve *B. ovis* (AY533146) sekansları ile % 100 benzerliğe sahip oldukları görülmüştür. DNA dizileri GenBank’a sunularak; KF266694, KF266695, KF434321 ve KF440691 numaraları alınmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye’de koyun ve keçilerde kenelerle nakledilen kan protozonları ile ilgili çalışmalarda; *T. lestoquardi* (27,28), *T. ovis* (8,14,28-31), *Theileria sp. OT3* (8), *Theileria sp. MK* (8), *B. ovis* (8,14,30,32,33), *B. motasi* (34) ve *B. crassa* (35) türlerinin varlığı ortaya konulmuştur. Bu türlerden *T. lestoquardi* ve *B. motasi*’nin Türkiye’deki varlığı sadece mikroskopik bakı ile yapılan az sayıdaki çalışmada bildirilmiştir (27,28,34). *T. lestoquardi*’nin enfekte hayvanların hiç birinde parazitemi oranından, şizontların varlığından ve diğer klinik bulgulardan bahsedilmemiştir (28). *B. crassa*’nın ise *Babesia* izolatlarının sekans analizine dayalı olarak yapılan bir çalışmada Türkiye’de tespit edildiği ileri sürülmüş ve AY260177 accession numarası ile gen bankasına kayıt edildiği görülmüştür (34). Diğer taraftan, son

yıllarda yapılan çalışmalarda yapılan çalışmalarda adı geçen türlere ait bilgiye rastlanılmamıştır. Sivas yöresinde yürütülen bu çalışmada da *T. lestoquardi* ve *B. motasi* bulunamamış, Türkiye’de yapılan çalışmaların büyük çoğunluğuna benzer şekilde *T. ovis*, *Theileria* sp. MK, *Theileria* sp. OT3 ve *B. ovis*’in varlığı ortaya konulmuştur.

Türkiye’nin farklı bölgelerinde, koyun ve keçilerde mikroskopik muayene ile yapılan çalışmalarda; theileriosisin prevalansı % 2,88-37,55 arasında (15,30,31,36) belirlenmiştir. Aynı metotla *B. ovis*’in prevalansı ise % 0,49-15,48 arasında (11,30,32,33,37) bulunmuştur. Karadeniz bölgesinde 7 ilde ve 1128 koyun ve keçide yürütülen bir çalışmada (30) mikroskopik muayene ile hiçbir hayvanda *Babesia* spp. tespit edilememiştir. Sivas yöresinde koyun ve keçiler üzerinde yürütülen bu çalışmada, mikroskopik muayene ile 8 örnekte (% 2,59) *Theileria* spp. piropasm formlarına rastlanmıştır. Bu çalışmaya dahil olan hiçbir kan frotisinde *Babesia* spp. belirlenememiştir. Diğer taraftan, aynı hayvanların RLB analizinde % 41,42’nin en az bir tür ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç ise, daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde (9,17) koyun ve keçilerde *Theileria* ve *Babesia* enfeksiyonlarının belirlenmesinde RLB’nin mikroskopik bakı ve PCR’den daha duyarlı olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Türkiye’de koyun theileriosisi üzerine moleküler metotların kullanıldığı ilk çalışmada, Aktaş ve ark. (10) Doğu Anadolu bölgesinde 218 koyuna ait kan örneğini soy spesifik PZR ile incelemişler, bu örneklerin % 41,2 (90/218)’sini *Theileria* spp. pozitif olarak bulmuşlardır. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinden tür spesifik PZR’nun kullanıldığı diğer bir çalışmada koyunların % 58,79’u, keçilerin ise % 11,27’sinde *T. ovis* yönünden pozitiflik belirlenmiş, aynı hayvanların *T. lestoquardi* spesifik PZR’ında hiçbir pozitif sonuç alınamamıştır (14). *B. ovis* spesifik PZR’in dünyada ilk defa uygulandığı ve Doğu Anadolu bölgesinden yürütülen bir çalışmada *B. ovis*’in bölgedeki koyun ve keçilerdeki prevalansı % 8,25 olarak bulunmuştur (11). Koyun ve keçilerde RLB metodunun Türkiye’de ilk defa uygulandığı, Iça ve ark. (38) tarafından yürütülen çalışmada Kayseri yöresinde incelediği örneklerin % 2,7’sinde *B. ovis*, % 34,2’sinde *T. ovis* pozitif sonuç elde edilmiştir. Yine RLB ile Doğu Anadolu bölgesinde koyun ve keçiler üzerinde yürütülen bir çalışmada; *B. ovis*, *T. ovis*, *Theileria* sp. MK ve *Theileria* sp. OT3 tespit edilmiş olup, prevalansları sırasıyla % 5,43, % 34,56, % 1,30 ve % 0,43 olarak bulunmuştur (8). *Theileria* sp. OT3’ün Türkiye’de ve *Theileria* sp. MK’nin ise dünyada varlığı yine aynı çalışma ile ilk olarak ortaya konulmuştur (8). Sivas yöresinde yürütülen bu çalışmada, RLB ile koyunlarda *T. ovis* pozitiflik oranı % 56,80, keçilerde % 3,88 toplamda ise % 39,16 olarak bulunmuştur. *Theileria* sp. OT3 pozitiflik oranı koyunlarda % 4,85, toplam hayvanlarda % 3,24 bulunurken, *Theileria* sp. MK pozitiflik oranı koyunlarda % 3,88 ve toplam hayvanlarda % 2,59 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar diğer çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde kenelerle nakledilen kan parazitlerinin Türkiye’nin hemen her bölgesinde yaygın olarak görüldüğünü göstermektedir.

Sivas yöresinde koyun ve keçiler ile bunlar üzerinden toplanan kenelerde moleküler düzeyde olmak üzere bir *Theileria* bir *Babesia* türü ve iki *Theileria* genotipi belirlenmiştir. Sivas yöresinde koyun ve keçilerde theileriosis neden olan tür ve genotiplerin *T. ovis*, *Theileria* sp. MK ve *Theileria* sp. OT3 olduğu, bölgede en yaygın türün ise *T. ovis* olduğu belirlenmiştir. İncelenen koyun ve keçilerde herhangi bir *Babesia* türü tespit edilememiştir. Bu sonuçlar Sivas yöresinde theileriosis ve babesiosisin koyun ve keçiler için ciddi bir sorun oluşturmadığını göstermekle birlikte, gerek kenelerde *B. ovis*’in belirlenmesi ve gerekse *Theileria* sp. MK ve *Theileria* sp. OT3’ün patojenitelerinin belirsizliği sebebiyle klinik enfeksiyon riskinin muhtemel olabileceği kanaatine varılmıştır. Bu çalışmada kan örneği alınan koyun ve keçiler üzerinden toplam 478 adet kene toplanmıştır. Keneler, *R. bursa*, *H. sulcata*, *H. marginatum*, *H. detritum* ve *D. marginatus* olarak tanımlanmıştır. Bölgedeki kene türlerinin ve özellikle mevsimsel

aktivitelerinin belirlenmesine yönelik uzun süreli çalışmaların yapılması gerektiği de görülmektedir.

AÇIKLAMALAR

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (CÜBAP-V009) tarafından desteklenmiş ve Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (50-96, 03.11.2011). Araştırma sonuçları 18. Ulusal Parazitoloji Kongresinde (Denizli, Türkiye) sunulmuştur.

Koyun ve keçilerden kan örneklerinin toplanmasına katkı sunan Sivas yöresi Veteriner Hekim ve Teknisyenlerine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Ahmed, J.S., Luo, J., Schnittger, L., Seitzer, U., Jongejan, F., Yin, H.** (2006). Phylogenetic position of small ruminant infecting piroplasms. *Ann NY Acad Sci*, 1081, 498-504.
2. **Friedhoff, K.** (1997). Tick-borne disease of sheep and goats caused by *Babesia*, *Theileria* or *Anaplasma* spp. *Parasitologia*, 39, 99-109.
3. **Hashemi-Fesharki, R.** (1997). Tick-borne diseases of sheep and goats and their related vectors in Iran. *Parasitologia*, 39, 115-117.
4. **Uilenberg, G.** (1981). *Theileria* species of domestic livestock. *Advances in the Control of Theileriosis*, Edr., Irvin, A.D., Cunningham, M.P., Young, A.S. 4-37, Martinus Nijhoff, The Hague.
5. **Uilenberg, G.** (2011). Babesiosis. *Encyclopedia of Arthropod-Transmitted Infections of Man and Domesticated Animal*, Ed., Service, M.W. 53-60, CABI Publishing, Wallingford.
6. **Yin, H., Liu, Z., Guan, G., Liu, A., Ma, M., Ren, Q., Luo, J.** (2008). Detection and differentiation of *Theileria luwenshuni* and *T. uilenbergi* infection in small ruminants by PCR. *Transbound Emerg Dis*, 55(5-6), 233-237.
7. **Yin, H., Schnittger, L., Luo, J., Seitzer, U., Ahmed, JS.** (2007). Ovine theileriosis in China: a new look at an old story. *Parasitol Res*, 101(2), 191-195.
8. **Altay, K., Dumanlı, N., Aktaş, M.** (2007b). Molecular identification, genetic diversity and distribution of *Theileria* and *Babesia* species infecting small ruminants. *Vet Parasitol*, 147(1-2), 161-165.
9. **Nagore, D., García-Sanmartín, J., García-Pérez, A.L, Juste, R.A, Hurtado, A.** (2004). Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in sheep population from Northern Spain. *Int J Parasitol*, 34, 1059-1067.
10. **Aktaş, M., Altay, K., Dumanlı, N.** (2005). Survey of *Theileria* parasites of sheep in eastern Turkey using polymerase chain reaction. *Small Ruminant Res*, 60, 289-293.
11. **Aktaş, M., Altay, K., Dumanlı, N.** (2007). Determination of prevalence and risk factors for infection with *Babesia ovis* in small ruminants from Turkey by polymerase chain reaction. *Parasitol Res*, 100(4), 797-802.
12. **Aktas, M.** (2014). A survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens. *Vet Parasitol*, 200, 276-283.
13. **Aktas, M., Ozubek, S.** (2015a). Molecular and parasitological survey of bovine piroplasms in the black sea region. Including the first report of babesiosis associated with *Babesia divergens* in Turkey. *J Med Entomol*, 52, 1344-1350.
14. **Altay, K., Aktas, M., Dumanli, N.** (2007a). *Theileria* infections in small ruminants in the east and southeast Anatolia. *Türkiye Parazitol Derg*, 31(4), 268-271.

15. Altay, K., Dumanlı, N., Aktaş, M. (2012). A study on ovine tick-borne hemoprotozoan parasites (*Theileria* and *Babesia*) in the East Black Sea Region of Turkey. *Parasitol Res*, 111(1), 149-153.
16. d'Oliveria, C., van der Weide, M., Habela, M.A., Jacquet, P., Jongejan, F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood by PCR. *J Clin Microbiol*, 33, 2665-2669.
17. Gubbels, J.M., de Vos, A.P., van der Weide, M., Viseras, J., Schouls, L.M., de Vries, E., Jongejan, F. (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol*, 37, 1782-1789.
18. Oura, C.A., Bishop, R.P., Wampande, E.M., Lubega, G.W., Tait, A. (2004). Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. *Int J Parasitol*, 34(5), 603-613.
19. Schnittger, L., Yin, H., Qi, B., Gubbels, M.J., Beyer, D., Niemann, S., Jongejan, F., Ahmed, J.S. (2004). Simultaneously detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasite infectin small ruminants by reverse line blotting. *Parasitol Res*, 92, 189-196.
20. Ozubek, S., Aktas, M. (2017). Molecular survey of ovine piroplasmiasis, including the first report of *Theileria* (Apicomplexa: Theileridae) in sheep and goats from Turkey. *J Med Entomol*, 54(1), 212-220.
21. Altay, K., Aktaş, M., Dumanlı, N. (2008). Detection of *Babesia ovis* by PCR in *Rhipicephalus bursa* collected from naturally infested sheep and goats. *Res Vet Sci*, 85(1), 116-119.
22. Kirvar, E., Ilhan, T., Katzer, F., Wilkie, G., Hooshmand-Rad, Brown, C.G.D. (1998). Detection of *Theileria lestoquardi* (*hirci*) in ticks, sheep, goats using polymerase chain reaction. *Ann NY Acad Sci*, 849, 52-62.
23. Sequeira, T.C., Oliveira, M.C., Araujo, J.P., Amarante, A.F. (2005). PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int J Parasitol*, 35(1), 105-111.
24. Estrada-Pena, A., Bouattour A., Camicas J.L., Walker A.R. (2004). Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. University of Zaragoza, Spain.
25. Merdivenci, A. (1969). Türkiye Keneleri Üzerine Araştırmalar. Kutulmuş Matbaası, İstanbul.
26. Georges, K., Loria, G.R., Riili, S., Greco, A., Caracappa, S., Jongejan, F., Sparagano, O. (2001). Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet Parasitol*, 4, 273-286.
27. Bauman, R., (1939). Die kleinasiatische schafftheilerios. *Berliner and Meunchener Tieraerztliche Wochenschrift*, 30, 469-474.
28. Hoffmann, G., Hörchner, F., Schein, E., Garber, H. (1971). Saisonalis auftrete von zecken und piroplasmen bei haustieren in den asiatischen provinzen der Türkei. *Berl Münch Tiraerztl Wschr*, 8, 152-156.
29. Lestoquard, F., Ekrem, I. (1931). Les piroplasmoses du mouton en Turquie. *Bull Soc Pathol Exot*, 2, 822-826.
30. Aydın, M.F., Aktaş, M., Dumanlı, N. (2013). Molecular identifiaion of *Theileria* and *Babesia* in sheep and goats in the Black Sea Rgeion of Turkey. *Parasitol Res*, 112(8), 2817-2824.
31. İnci, A., Nalbantoğlu, S., Çam, Y., Atasever, A., Karaer, Z., Çakmak, A., Sayın, F., Yukarı, B.A., Iça, A., Deniz, A. (2003). Kayseri yöresinde koyun ve keçilerde theileriosis ve kene enfestasyonları. *Turk J Vet Anim Sci*, 27: 57-60.
32. İnci, A., Karaer, Z., Iça, A. (2002). Kayseri yöresinde koyun ve keçilerde babesiosis. *FÜ Sağ Bil Derg*, 16(1), 79-83.
33. Sevinç, F., Dik, B. (1996). Konya yöresindeki koyunlarda *Babesia ovis*'in ELISA ile teşhisi. *Vet Bil Derg*, 12(2): 73-79.
34. Açııcı, M., Umur, Ş., Kurt, M., Beyhan, YE., Pekmezci, GZ. (2007). Orta Karadeniz bölgesi ve Sivas yöresi sığır ve koyunlarında kan parazitlerinin retrospektif incelenmesi. 15th. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kayseri ve Ürgüp, 166.

35. **Schichnittger, L., Yin, H., Gubbels, M.J., Beyer, D., Niemann, S., Jongejan, F., Ahmed, J.S.** (2003). Phylogeny of sheep and goat *Theileria* and *Babesia* parasites. *Parasitol Res*, 91, 398-406.
36. **Sayın, F., Nalbantoğlu, S., Yukarı, BA., akmak, A., Karaer, Z.** (2009). Epidemiological studies on sheep and goat *Theileria* infection. *AÜ Vet Fak Derg*, 56, 127-129.
37. **iek, H., Düzgün, A., Emre, Z., Karaer, Z.** (2004). Seroprevalance of *Babesia ovis* in sheep around Afyon. *Turk J Vet Ani Sci*, 28, 683-686.
38. **Ia, A., Yıldırım, A., İnci, A.** (2005). Kayseri yöresinde koyunlarda kan protozoonlarının reverse line blotting yöntemi ile araştırılması. 14th. Ulusal Parazitoloji Kongresi, İzmir, 161.