T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR YÖRESİNDE KOYUNLARDA *BABESIA OVIS*'İN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEHMET BOZAN

2024

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

DİYARBAKIR YÖRESİNDE KOYUNLARDA *BABESIA OVIS*'İN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Tez Yazarı
Mehmet BOZAN

Danışman
Doc. Dr. Sezayi ÖZÜBEK

MART, 2024
ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ONAY SAYFASI

Tez Başlığı: **DİYARBAKIR YÖRESİNDE KOYUNLARDA *BABESIA OVIS*'İN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Tez Yazarı:

Program/ Anabilim Dalı:

Tez Danışmanı:

Tez İlk Teslim Tarihi: 29/03/2024 Tez Savunma Tarihi: 03/05/2024

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan _____

Üye _____

Üye _____

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun ...../...../20..... tarihli toplantısında tescillenmiştir.

_____

Prof. Dr. Mustafa İSSİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

MEHMET BOZAN

03.05.2024

İmza

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerini benimle paylaşan ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Sezayi ÖZÜBEK başta olmak üzere Parazitoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Çalışmamın her aşamasında emeğini, bilgisini ve her türlü desteğini esirgemeden bana rehberlik eden Prof. Dr. Münir AKTAŞ, Arş. Gör. Dr. Mehmet Can ULUÇEŞME, Doktora Öğrencisi Veteriner Hekim Arda EYVAZ'a Saha çalışmalarında örneklerin toplanmasına destek veren Veteriner Hekim Abdullah KAÇMAZ ve Veteriner Hekim Firdevs ÇİFTÇİ ile tezimin serolojik analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ferda SEVİNÇ ve Doç. Dr. Onur CEYLAN'a ve tez çalışmamı maddi olarak destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (FÜBAP, Proje No: VF.23.26) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI ..... **i**

ETİK BEYAN ..... **i**

TEŞEKKÜR ..... **ii**

İÇİNDEKİLER ..... **iii**

TABLOLAR LİSTESİ ..... **v**

ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **vi**

KISALTMALAR LİSTESİ ..... **vi**

1.ÖZET ..... **viii**

2. ABSTRACT ..... **x**

3. GİRİŞ **1**

4. GEREÇ VE YÖNTEM **7**

4.1. Saha Çalışmaları 7

4.2. Laboratuvar Çalışmaları 9

4.2.1. DNA Ekstraksiyonu 9

4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 9

4.2.3. Indirekt ELISA (iELISA) 12

4.3. İstatistiksel Analiz 13

5. BULGULAR **14**

6. TARTIŞMA **18**

7. KAYNAKLAR 24

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Kan örneği alınan odaklar ile örneklerin odaklara dağılımı. 8

Tablo 2. Bu çalışmada kullanılan primerler. 11

Tablo 3. Nested PCR ve iELISA sonuçlarının odaklara göre dağılımı. 14

Tablo 4. Nested PCR ve iELISA ile elde edilen pozitiflik durumunun yaş ile ilişkisi. . 17

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Saha çalışmalarının yürütüldüğü odaklar. 7

Şekil 2. Babesia ovis 18S rRNA geni ile çalışmada kullanılan primerlerin amplifiye edeceği bölgenin şematik gösterimi. 10

Şekil 3. Koyunlardan elde edilen genomik DNA'ların kontrolü amacıyla koyun ovine integrin alpha M genine ait PCR'in agaroz jel görüntüsü. (M: Marker; 1: Negatif kontrol; 2: Pozitif kontrol; 2-29: Saha örnekleri) 14

Şekil 4. Sahadan toplanan örneklerin nPCR agaroz jel görüntüsü. A) Nbab 1F-Nbab1R primerleri ile yapılan 1 PCR'a ait agaroz jel görüntüsü, B) BboF-BboR primerleri ile yapılan nPCR'a ait agaroz jel görüntüsü. (M: Marker; 1: Negatif kontrol; 2: Pozitif kontrol; 2 15

Şekil 5. ELISA testinde rBoSA1'e karşı pozitif ve negatif reaksiyon veren serum örnekleri. 16

Şekil 6. a) Nested PCR ve iELISA ile elde edilen pozitif örneklerin karşılaştırılması. b) Nested PCR ve iELISA ile elde edilen pozitiflik durumunun yaş ile ilişkisinin karşılaştırılması. 17

KISALTMALAR LİSTESİ

µl : Mikrolitre

µm : Mikrometre

bç : Baz çifti

BoSA1 : *Babesia ovis* secreted antigen 1

DNA : Deoksiribonükleik asit

DNaz : Deoksiribonükleaz

dNTP : Deoksinükleotrifosfat

ELISA: Enzyme linked immosorbent assay

gDNA : genomik DNA

HCl : Hidroklorik asit

iELISA : İndirek Enzyme linked immosorbent assay

IFAT : İndirek Floresan Antikor Testi

M : Molar

ml : Mililitre

mM : Milimolar

nPCR: Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pH : Potansiyel hidrojen

pmol : Pikomol

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RPM: Revolutions Per Minute (dakikadaki devir sayısı)

TMB: Tetramethylbenzidine

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

UV : Ultraviyole

1.ÖZET

DİYARBAKIR YÖRESİNDE KOYUNLARDA *BABESİA OVİS*'İN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Babesia ovis'in neden olduğu babesiosis, Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinde koyunlarda yaygın olarak görülen, özellikle *Rhipicephalus bursa* türü kenelerin baskın olduğu bölgelerde, ateş, anemi, sarılık ve hemoglobinüri gibi semptomların yanı sıra, yüksek ölüm oranlarına neden olan mevsimsel bir hastalıktır. Türkiye'de *B. ovis*'in prevelansını ortaya koyan mikroskobik, serolojik ve moleküler yöntemlerin kullanıldığı çok sayıda epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. Ancak, önceki çalışmalarda *B. ovis*'in moleküler ve serolojik birleşik tespiti aynı çalışmada kullanılmamıştır.

Bu çalışmada, nested PCR ve indirekt ELISA kombine kullanılmasıyla Diyarbakır yöresindeki koyunlarda *B. ovis*'in epidemiyolojisi üzerine güncel ve kapsamlı verilerin sağlanması amaçlanmıştır. Nisan-Temmuz 2023 tarihleri arasında Diyarbakır iline bağlı Bağlar, Bismil, Çermik, Çınar ve Sur ilçelerinde rastgele seçilen 12 işletmede bulunan 414 adet koyundan EDTA'lı ve serum tüplerine kan örnekleri alınmıştır. Örnek alınan koyunların yaş, alındığı odak ve tarih bilgileri ilgili protokole kaydedilmiştir.

Moleküler prevelans için örneklerde *B. ovis* DNA'sının varlığı *18S ribosomal RNA (rRNA)* geni hedeflenerek nested PCR ile amplifiye edilmiş ve 414 koyunun 8'inde (%1,9) pozitiflik saptanmıştır. Seroloprevalansı prevalansı belirlemek için enfekte eritrositlerin sitoplazmasında bol miktarda bulunduğu bilinen *B. ovis*-SA1 (BoSA1) immun reaktif protein kullanılmıştır. iELISA testi ile incelenen 414 serum örneğinin 248'i (%59.9) anti-*B. ovis* antikorları yönünden pozitif bulunmuştur. Nested PCR ile pozitif bulunan örneklerin tamamı iELISA ile de pozitif bulunmuş ve her iki

testte elde edilen pozitiflik oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0,05).

Sonuç olarak bu çalışma ile Diyarbakır ilinde koyunlarda *B. ovis*'in seroprevalansı yüksek belirlenirken moleküler prevalansın düşük olduğu görülmüştür. Bu farklılık özellikle koyunlarda *B. ovis* bulunmasa bile, anti-*B. ovis* antikorlarının serumda uzun süre kalması ve serolojik olarak tespit edilmesi ile ilgili olabilir. Ayrıca, moleküler prevalansın düşük olmasının, kenelerin aktif olduğu dönemlerde babesiosis tedavisinde yaygın kullanılan imidocarb dipropionat'ın kontrolsüz uygulamalarından da kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu çalışma ile koyun popülasyonlarında *B. ovis*'in yaygınlığını değerlendirirken moleküler ve serolojik yöntemlerin bir arada kullanılmasının önemi bir kez daha gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Babesia ovis*, ELISA, epidemiyoloji, koyun, PCR

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF *BABESIA OVIS* IN SHEEP USING SEROLOGICAL AND MOLECULAR METHODS IN THE DİYARBAKIR REGION.

Babesiosis caused by *Babesia ovis* is a seasonal disease widely prevalent among sheep in various geographical regions of Turkiye, particularly in areas dominated by the tick species *Rhipicephalus bursa,* leading to high mortality rates along with symptoms such as fever, anemia, jaundice, and hemoglobinuria. Numerous epidemiological studies have been conducted in Turkiye to determine the prevalence of *B. ovis* using microscopic, serological, and molecular methods. However, in previous studies, the combined detection of *B. ovis* through both molecular and serological methods has not been utilized in the same study.

In this study, the aim was to provide current and comprehensive data on the epidemiology of *B. ovis* in sheep in the Diyarbakır region by using a combination of nested PCR and indirect ELISA. Blood samples were collected from 414 sheep in 12 randomly selected farms in the Bağlar, Bismil, Çermik, Çınar and Sur districts of Diyarbakır province between April and July 2023. Information regarding the age, location of sampling, and date of collection for each sampled sheep was recorded according to the relevant protocol.

For molecular prevalence, the presence of *B. ovis* DNA in the samples was amplified using nested PCR targeting the *18S ribosomal RNA* (*rRNA*) gene, and positivity was detected in 8 out of 414 sheep (1.9%). To determine seroprevalence, the *B. ovis*-SA1 (BoSA1) immunoreactive protein, known to be abundant in the cytoplasm of infected erythrocytes, was used. Among the 414 serum samples examined using

iELISA, 248 (59.9%) were found to be positive for anti-*B. ovis* antibodies. All samples that were positive by nested PCR were also positive by iELISA, and the difference in positivity rates between the two tests was statistically significant ($p<0.05$).

In conclusion, this study revealed a high seroprevalence of *B. ovis* in sheep in Diyarbakır province, while molecular prevalence was found to be low. This difference may be attributed to the prolonged presence of anti-*B. ovis* antibodies in the serum even in the absence of *B. ovis* in sheep, and it may also be related to the uncontrolled use of imidocarb dipropionate, commonly used for babesiosis treatment during active tick periods. The importance of using both molecular and serological methods together in evaluating the prevalence of *B. ovis* in sheep populations has been once again demonstrated by this study.

Keywords : *Babesia ovis*, ELISA, epidemiology, PCR, sheep

3. GİRİŞ

Koyun ve keçiler, sığırların evcilleştirilmesinden binlerce yıl önce, insanlar tarafından ilk evcilleştirilen hayvanlar arasındadır. Bu hayvanlar, çeşitli iklim ve coğrafi koşullara uyum sağlama yetenekleri sayesinde, gelişmekte olan ülkelerde ve ekonomik zorluklarla mücadele eden kırsal topluluklarda yaşam kalitesini artırma potansiyeline sahiptir. Hayvancılık sektörü, koyun ve keçilerin üretimi üzerinden ulusal ekonomilere önemli katkılar sunmaktadır. Türkiye, iklimi ve coğrafyasıyla küçükbaş hayvancılığın gelişimi için oldukça elverişli bir konumda bulunmaktadır. 1991 yılında nüfusu 56,5 milyon olan ülkede, küçükbaş hayvan varlığı 51 milyonun üzerindeyken, zamanla bu rakamın düşmeye başladığı gözlenmiştir. Ancak son dönemde, özellikle koyun-keçi yetiştiriciliğine verilen desteklerle birlikte üretimde canlanma yaşandığı görülmüştür (Elmaz ve ark., 2015). Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2023 yılı verilerine göre, yaklaşık 42 milyon baş koyun ve 10 milyon baş keçi bulunmaktadır (Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK], 2023). Her ne kadar bu sayılar ile Avrupa'da önemli bir yerde olsa da daha fazla küçükbaş hayvan üretiminin teşvik edilmesi gerektiği ve ekonomik açıdan erişilebilir et üretiminin bu destekler ile mümkün olabileceği belirtilmektedir. Gelişmekte olan ve geri kalmış ülkelerde, hızla artan nüfusla birlikte gıda güvenliği ve ihtiyacı önemli bir sorun haline gelmiştir. Bu sorunun üstesinden gelmede tarım ve hayvancılık sektörlerinin rolü büyüktür. Gelecekte, gıda kıtlığını aşma yolunda çiftlik hayvanlarının üretiminin artırılmasının, çözüm yollarından biri olabileceği düşünülmektedir (Elmaz ve ark., 2015).

Keneler, diğer eklem bacaklı vektör gruplarına göre daha geniş bir yelpazede protozoon, bakteriyel, riketsiyal ve viral patojenleri taşıma kapasitesine sahiptir. Aynı zamanda, toksinler ve alerjenler gibi etkenlerle birlikte, konakçı organizmalarında doğrudan zarara neden olabilirler. Ülkemiz de dahil olmak üzere geniş coğrafyalarda yaygın olarak görülen *Theileria* ve *Babesia* türleri gibi keneler aracılığıyla bulaşan patojenler, hem evcil hem de yabani hayvanlarda klinik ve subklinik enfeksiyonlara neden olarak ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Friedhoff, 1997; Jongejan ve Uilenberg, 2004).

Babesiosis, *Babesia* türlerinin sebep olduğu, özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerde evcil ve yabani hayvanlarda sıkça görülen, zoonotik nitelik taşıyan bir protozoon hastalığıdır (Schnittger ve ark., 2012). Koyun ve keçilerde özellikle *Babesia ovis, B. motasi* ve *B. crassa* türlerinin babesiosis'e yol açtığı bildirilmiştir. *Babesia taylori* ve *B. foliata* yıllar önce Hindistan'da koyun ve keçilerde bildirilmiştir ancak o tarihten bu yana bu iki tür hakkında yeterli bir bilgi bulunmamaktadır (Schnittger ve ark., 2022). Tanımlanan bu türlerin yanı sıra ayrıca koyunlarda *Babesia* sp. Xinjiang ve keçilerde *Babesia aktasi* gibi yeni türler de rapor edilmiştir (Guan ve ark., 2009; Özübek ve ark., 2023). Koyunlarda en fazla ekonomik kayba neden olan etken *B. ovis*'tir. Güney Avrupa, Afrika, Orta Doğu ve Asya'da yaygın olan *B. ovis*, ateş, hemolitik anemi ve hemoglobinüri ile karakterize edilen klinik bulgulara neden olur ve ölümlere yol açar. *Babesia ovis*, koyun ve keçilere özellikle *Rhipicephalus bursa, R. turanicus, R. sanguineus* ve *R. annulatus* türü keneler aracılığıyla bulaşır (Aydın ve Bakırcı, 2007; Erster ve ark., 2016).

Babesia ovis'in yayılma dinamiği, *Rhipicephalus* kenelerinin (özellikle *R. bursa*) biyolojisi ve ekolojisiyle sıkı bir bağa sahiptir. Ülkemiz dahil Akdeniz havzasında yaygın olarak bulunan *R. bursa, B. ovis*'in ana vektörü olarak rol oynar (Erster ve ark.,

2016). *Rhipicephalus bursa*, iki konaklı bir gelişim özelliği gösterir ve hem erişkin hem de immatür (larva, nimf) dönemlerinde koyun ve keçilerden kan emer (Walker ve ark., 2000). *Babesia* sensu stricto grubuna ait olan *B. ovis*, vektör keneler aracılığıyla transtadial ve transovarial olarak bulaşabilir. Vektör kenelerde sırasıyla gametosit, zigot, kinet, sporoblast ve sporozoit formları bulunur (Jalovecka ve ark., 2019). *Babesia ovis* kaynaklı klinik enfeksiyonlar, genellikle erişkin *R. bursa* aktivitesinin arttığı Mayıs-Temmuz ayları arasında rapor edilmiştir (Yeruham ve ark., 1998). Saha koşullarında hastalığa bağlı ölüm oranı, verilen sporozoit miktarına, parazit suşunun çeşitliliğine ve konakçının duyarlılığına bağlı olarak %12 ile %50 arasında değişebilir (Sevinç ve ark., 2013). Ayrıca, akut enfeksiyon sırasında ve iyileşme sürecinde et, süt ve üreme veriminde ciddi ekonomik kayıplar görülebilir. *Babesia ovis*, Türkiye'nin dâhil olduğu Akdeniz havzasının geniş bir alanda %2 ile %49 arasında değişen bir yaygınlığa sahiptir (Ceylan ve Sevinç, 2020; Ceylan ve ark., 2021). Ancak hastalığın ciddi ekonomik etkisine rağmen, küçükbaş hayvanlarda babesiosis ihmal edilen bir hastalık olarak kalmıştır (Sevinç ve Xuan, 2015a).

Günümüzde *B. ovis*'ten kaynaklı koyun babesiosis'inin kontrol ve korunmasında, klinik enfeksiyona yakalanan hayvanların imidocarb dipropionat ile tedavi edilmesi ve konaklarda kene mücadelesi olmak üzere iki temel strateji uygulanmaktadır (Sevinç ve ark., 2007; 2015a). Sahada imidocarb dipropionat'ın klinik enfeksiyonu tedavi etmedeki etkinliği konusunda şu an için bir problem yaşanmamaktadır (Sevinç ve ark., 2007). Ancak söz konusu kimyasalın süt ve ette kalıntı problemi oluşturması, tedavideki etkinliğini gölgelemektedir (Özübek ve ark., 2020). Ayrıca ilacın koyun yetiştiricileri tarafından bilinçsiz (özellikle küçükbaş hayvanlarda hastalık sezonunda her ne sebepten olursa olsun hafif keyifsizlik durumunda ilaç verilmesi) bir şekilde kullanılıyor olması, ilaç direncinin gelişmesi yanında et ve süt gibi temel hayvansal ürünlerde toksik

metabolitlerin birikmesine ve halk sağlığı riski oluşturmaya yol açmaktadır (Sevinç ve Xuan, 2015a).

Koyun ve keçilerde kene enfestasyonlarını engellemek için kenelerin aktif olduğu yaz sezonu boyunca (özellikle *R. bursa*'nın pik yaptığı Mayıs-Temmuz) 28 gün arayla düzenli bir şekilde yapılması gereken akarisit (Flumethrin) uygulaması (Şaki ve ark., 2008), yetiştiriciler tarafından genellikle yılda bir kez (hayvanların meraya çıktığı ilk ay) yapılmakta ya da hiç yapılmamaktadır. Bu durum, koyunların enfekte vektör kene ile temasını önlemede yetersiz kalmakta ve sezon boyunca sürüde klinik babesiosis vakalarını artırmaktadır. 2020 yılında Türkiye'nin bütün illerini kapsayan bir çalışmada, *B. ovis*'in endemik yapısı instabil olarak tespit edilmiş ve hastalığa karşı korunmada etkili bir aşıya ihtiyaç olduğu rapor edilmiştir (Ceylan ve Sevinç, 2020). Dolayısı ile koyunlarda önemli ve ihmal edilen bir hastalık olan babesiosisin neden olduğu ekonomik kayıpların, özellikle instabil bölgelerde çok daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Bu kayıpların önüne geçmek için, yukarda bahsedilen temel iki stratejinin yanında, koyun ve keçilerin *B. ovis*'e karşı immunize edilmesi gibi diğer alternatif korunma yöntemlerinin de geliştirilmesi ve devreye sokulması gerekmektedir (Sevinç ve Xuan, 2015a ; Ceylan ve ark., 2021).

Geleneksel olarak, akut fazda babesiosis teşhisi için kan yaymalarının mikroskobik incelemesiyle parazit tespiti yapılır. Babesiosisten iyileşme sonrasında, kronik enfeksiyonun başlangıcında, klinik semptom göstermeyen taşıyıcı hayvanlarda parazitemi çok düşük bir seviyeye düşer ve genellikle mikroskobik olarak parazit tespit edilemez. PCR tabanlı teşhisler ise yüksek özgünlükle ve duyarlılıkla paraziti doğrudan tespit etme potansiyeline sahiptir (Mosqueda ve ark., 2012). Bununla birlikte, taşıyıcı hayvanların parazitleri, zaman zaman direkt PCR ile tespit edilememektedir bu da duyarlılığı en üst düzeye çıkarmak için nested PCR (nPCR) testi gereksinimini ortaya

çıkarmıştır (Oliveira-Sequeira ve ark., 2005; Martins ve ark., 2008). Alternatif olarak, immünoflorasan antikor testi (IFAT) ve enzim bağlı immünsorbent test (ELISA) gibi serolojik teşhis yöntemleri, parazite özgü antikorları tespit etmek için uygulanmaktadır (Mosqueda ve ark., 2012).

Türkiye'de *B. ovis*'in yaygınlığını ortaya koyan mikroskobik, serolojik ve moleküler yöntemlerin kullanıldığı çok sayıda çalışma yapılmıştır. Mikroskobik olarak ilk veri 1912 tarihinde İstanbul'da koyunlarda bildirilmiştir (Göksu, 1967; Aydın ve Dumanlı, 2019). O tarihten bugüne Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde yapılan çalışmalarda *B. ovis* mikroskobik olarak %0,5-%22,2 oranlarında tespit edilmiştir (Aydın ve Dumanlı, 2019; Ceylan ve ark., 2021). Serolojik olarak ilk veri 1979 yılında bildirilmiştir (Özkoç, 1979). Immünoflorasan antikor testi (IFAT) ve enzim bağlı immünsorbent test (ELISA) kullanılarak birçok çalışma yürütülmüş ve bu çalışmalarda Türkiye'de *B. ovis*'in serolojik prevelansı %30,5- %80,2 arasında bildirilmiştir (Aydın ve Dumanlı, 2019; Ceylan ve ark., 2021). Moleküler olarak ilk veriler ise 2005 yılında bildirilmiş (Aktaş ve ark., 2005) ve bugüne kadar moleküler prevelans %2,6-%21,4 olarak bildirilmiştir (Aydın ve Dumanlı, 2019; Ceylan ve ark., 2021).

Babesia ovis SA1 (BoSA1) *B. ovis* tarafından salgılanan immünoreaktif bir proteindir. Bu proteinin anti-*B. ovis* antikorlarını tespit edebilecek güçlü antijenik yapılara sahip olduğu ve doğal BoSA1 proteininin enfekte eritrositlerin sitoplazmasında bol miktarda bulunduğunu bildirilmiştir (Sevinç ve ark., 2015b). Bu salgı proteininin, parazitin aseksüel gelişimi sırasında intravasküler hemoliz nedeniyle enfekte kırmızı kan hücrelerinden dolaşıma salgılandığı düşünülmektedir. *Babesia ovis* rBoSA1'e karşı şekillenmiş olan spesifik antikorlar enfeksiyonun 7. ve 8. günlerinden başlayıp enfeksiyondan sonraki 2.5 aylık döneme kadar tespit edilebilir olduğu gösterilmiştir (Sevinç ve ark., 2015b). Bu protein kullanılarak yapılan bir çalışmada Türkiye'nin 81

ilinde koyunlardan serum örnekleri toplanmış ve ELISA ile *B. ovis*'in serolojik prevelansı %29,9 olarak belirlenmiştir (Ceylan ve Sevinç, 2020).

Moleküler ve serolojik testlerin bir araya getirilmesi, *Babesia* enfeksiyonlarının doğru teşhisi ve epidemiyolojik araştırmalar için güçlü bir araç sağlar (Bose ve ark., 1990; Figueroa ve ark., 1993). Nested PCR ve ELISA testleri kullanılarak yapılan çalışmalarda bu verileri destekler niteliktedir (Terkawi ve ark., 2011; Terkawi ve ark., 2012; da Silva JB ve ark., 2013).

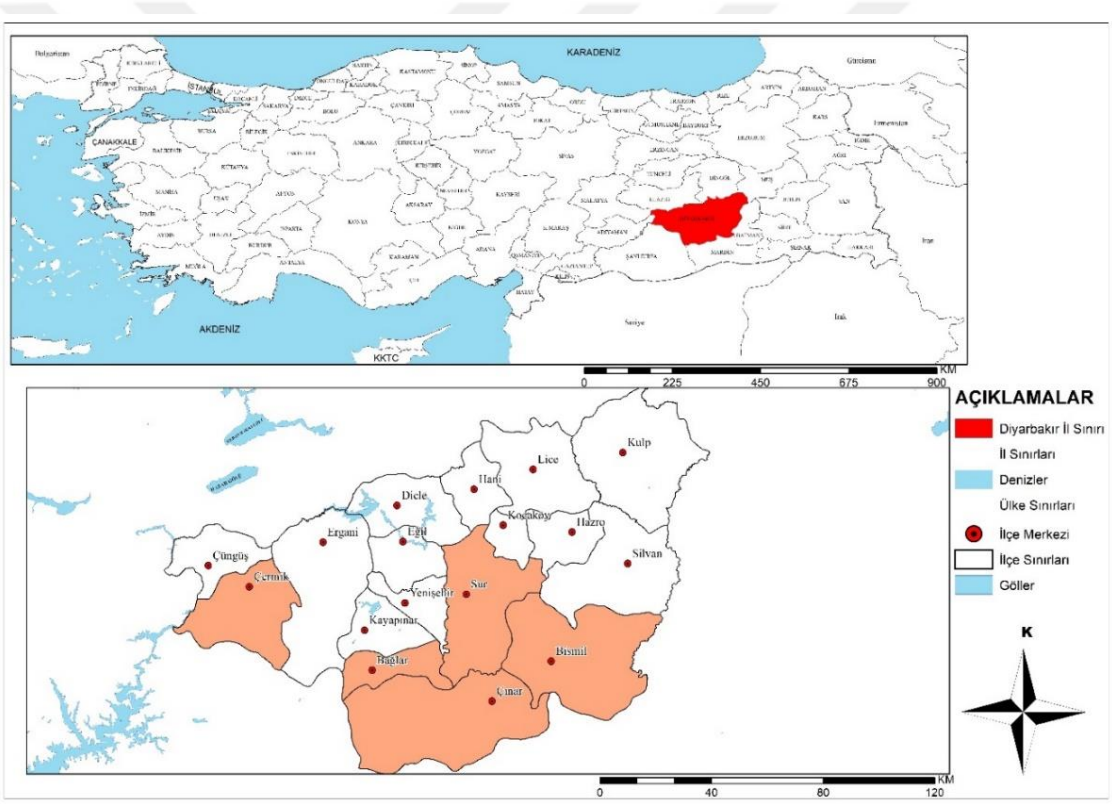
Serolojik testler, enfekte hayvanlarda parazit varlığının zamanlaması ve antikor yanıtları ile nPCR testinden daha fazla enfekte hayvan tespit etmiştir. Kronik enfeksiyonlar sırasında, antikorlar parazit temizlendikten sonra bile dolaşımda uzun bir süre kalırken, parazit DNA'sı nPCR ile tespit edilemez (Carrique ve ark., 2000). Bu nedenle, moleküler ve serolojik tespit yöntemlerinin birleştirilmesi, doğru tanı ve epidemiyolojik araştırmalar için güçlü bir araç sağlar (Terkawi ve ark., 2011; Terkawi ve ark., 2012; da Silva JB ve ark., 2013).

Diyarbakır'da *B. ovis* prevalansının mikroskobik, serolojik ve moleküler yöntemlerle sırasıyla %0,6-2, %20-53 ve %3 olarak belirlenmesi, enfeksiyonun yaygınlığının farklı teşhis yöntemleriyle değişebileceğini göstermektedir (Özer ve ark.,1993; Aktaş ve ark., 2007; Ceylan ve Sevinç 2020). Ancak, önceki çalışmalarda antikorların (serolojik) ve DNA'nın (moleküler) eş zamanlı tespiti aynı çalışmada kullanılmamıştır. Bu durum, enfeksiyonun prevalansının ve epidemiyolojisinin tam olarak anlaşılamadığını göstermektedir. Bu çalışmada, nPCR-ELISA kombinasyonunun kullanılmasıyla Diyarbakır yöresindeki koyunlarda *B. ovis*'in epidemiyolojisi üzerine güncel ve kapsamlı verilerin ortaya konulması amaçlanmaktadır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Saha Çalışmaları

Nisan-Temmuz 2023 tarihleri arasında Diyarbakır iline bağlı Bağlar, Bismil, Çermik, Çınar ve Sur ilçelerinde rastgele seçilen 12 işletmedeki 414 koyun üzerinde saha çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 1). Farklı odaklardaki sürüler belirlenirken, önceki sezonda babesiosis semptomları (ateş, sürünün gerisinde kalma, kan işeme) göstermiş olan sürüler çalışmaya dahil edilmiştir.



Şekil 1: Saha çalışmalarının yürütüldüğü odaklar.

Diyarbakır şehri, sönmüş volkanik bir dağ olan Karacadağ'ın doğu kenarında, Dicle Vadisi'nden 100 m kadar yükseklikte yarı çanağa benzeyen bir zemin üzerine kurulmuştur. Diyarbakır'da oldukça sert bir karasal iklim hakimdir. Yaz ayları son derece sıcak geçer; Temmuz ayı ortalama sıcaklıkları genellikle 35ºC'nin üzerindedir.

Diyarbakır'da kış ve yaz sıcaklıkları arasındaki önemli farklar nedeniyle, bu bölgede karasallık derecesi son derece yüksektir. Bu nedenle, Türkiye'de buharlaşmanın en yüksek değerlerine Diyarbakır havzasında rastlanır. Diyarbakır'da yıllık sıcaklık ortalaması genellikle 17-18°C civarında seyreder. Yıllık ortalama yağış miktarı yaklaşık 350-400 mm civarındadır (Toprak ve ark., 2009).

Meraya çıkan 414 koyundan EDTA'lı ve serum tüplerine kan örnekleri alınmıştır. Örnek alınan koyunların yaş, alındığı odak ve tarih bilgileri ilgili protokole kaydedilmiştir. EDTA'lı ve serum tüplerine alınan kan örnekleri +4°C'yi sağlayan termos içinde Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilmiştir. EDTA'lı tüpler DNA ekstraksiyonu yapılıncaya kadar -20˚C'de muhafaza edilmiştir. Serum tüplerindeki kan numuneleri 3000 RPM'de devirde 15 dk santrifüj edilerek serumları mikrosantrifüj tüplere alınarak -20°C'de muhafaza edilmiştir. Alınan örnek sayısının odaklara göre dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Kan örneği alınan odaklar ile örneklerin odaklara dağılımı.

Odak	**İşletme sayısı**	**Alınan örnek sayısı**
Bağlar	2	65
Bismil	2	40
Çermik	2	33
Çınar	3	142
Sur	3	134
Toplam	**12**	**414**

4.2. Laboratuvar Çalışmaları

4.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA ekstraksiyonu için ticari bir DNA izolasyon kiti olan PureLinkTM Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) kullanılarak aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

1. Eppendorf tüplere 200 µl kan örneği alınmış ve üzerlerine Proteinase-K ve RNase A (20 µl) eklenerek vortekslenmiştir.

2. Oda sıcaklığında 2 dk bekletildikten sonra, 200 µl Genomic Lysis/Binding Buffer eklenip vortekslenmiş ve 55ºC'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

3. Inkubasyondan sonra üzerlerine 200 µl %96 etanol eklenip 5 saniye vortekslenmiştir.

4. Collection tüp, spin column'a yerleştirildikten sonra elde edilen lizat spin column'a dökülüp 10.000 x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

5. Collection tüp atılmış ve yeni bir collection tüpe yerleştirilen spin column'un üzerine 500 µl Wash Buffer 1 eklenip 10.000 x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

6. Lizata 500 µl Wash Buffer 2 eklenerek santrifüj işlemi tekrarlanmıştır.

7. Spin column steril mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilip üzerlerine 100 µl Genomic Elution Buffer eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakılmıştır.

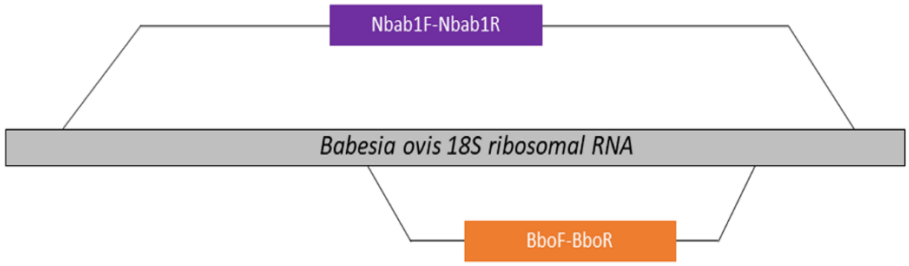
8. Daha sonra 23.000 x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

9. Elde edilen genomik DNA'lar kullanılıncaya kadar -20ºC'de saklanmıştır.

4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Koyunlardan elde edilen genomik DNA'lar öncelikle ekstraksiyonun sağlıklı bir şekilde yapıldığından emin olmak için koyun *ovine integrin alpha M* genini amplifiye eden OaITGAM F (5'-TGGATGGACTGGTAGACTTG-3') ve OaITGAM R

(5’GGGTCACGACATTCATACAC-3’) primerler ile amplifiye edilmiştir (Erster ve ark., 2016). Tüm ürünlerin genomik DNA’sından emin olunduktan sonra Nbab1F (5′-AAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCTTTT-3′) ve Nbab1R (5′-CCTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTCAC-3′) primerleri kullanılarak *Theileria*/*Babesia* türlerinin *18S ribosomal RNA* (rRNA) geninde yaklaşık 1600 baz çifti (bç) uzunluğunda bir bölge amplifiye edilmiştir (Oosthuzien ve ark., 2008). Elde edilen PCR ürünleri kullanılarak *B. ovis*’in *18S rRNA* geninde yaklaşık 549 bç uzunluğunda bir bölgeyi çoğaltan BboF (5’- TGGGCAGGACCTTGGTTCTTCT-3’) ve BboR (5’-CCGCGTAGCGCCGGCTAAATA-3’) primerleri ile nested PCR yapılmıştır (Aktaş ve ark., 2005) (Şekil 2).



Şekil 2. Babesia ovis 18S rRNA geni ile çalışmada kullanılan primerlerin amplifiye edeceği bölgenin şematik gösterimi.

Nested PCR analizleri Sensoquest (Labcycler Gradient) marka cihazda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, toplam 25 µl hacimde [2,5 µl 10X PCR Buffer, 2,5 µl dNTP (1,25 mM), 0,5 µl Primer F (10 µM), 0,5 µl Primer R (10 µM), 0.1 µl Taq DNA polymerase, 16,5 µl su ve 2,5 µl genomik DNA] gerçekleştirilmiştir.

Her PCR reaksiyonunda, laboratuvar stoklarımızda bulunan *B. ovis* (GenBank kayıt numarası: PP471910) pozitif kontrol DNA örnekleri kullanılmıştır. Negatif kontrol için her bir PCR’ı temsilen steril distile su kullanılmıştır. Nested PCR aynı koşullarda gerçekleştirilecek olup genomik DNA yerine ilk PCR’dan elde edilen amplikondan 1 ul kullanılmıştır. Nested PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen

amplikonlar %1,4'luk agaroz jelde elektroforoze tabi tutulmuş ve yaklaşık 30 dk yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonrası agaroz jel, Quantum Vilber Lourmat (Fransa) marka jel görüntüleme sisteminde incelenmiştir. Çalışmada kullanılan primerler ile PCR şartları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Bu çalışmada kullanılan primerler.

Primer	**Sekans (5'-3')**	**PCR sartları**	**Ürün Büyüklüğü baz çifti (bç)**
Nbab 1F	AAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCTTTT	94ºC 5 dakika; 94ºC 30 saniye, 67ºC 1 dakika, 40 siklus 72ºC 1 dakika, 72ºC 30 dakika	1600 bç
Nbab 1R	CCTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTCAC		
BboF	TGGGCAGGACCTTGGTTCTTCT	94ºC 3 dakika; 94ºC 30 saniye, 61ºC 30 saniye, 40 siklus 72ºC 30 saniye, 72ºC 5 dakika	549 bç
BboR	CCGCGTAGCGCCGGCTAAATA		
OaITGAMF	TGGATGGACTGGTAGACTTG	94ºC 5 dakika; 94ºC 30 saniye, 55ºC 30 saniye, 40 siklus 72ºC 30 saniye 72ºC 5 dakika	140 bç
OaITGAMR	GGGTCACGACATTCATACAC		

4.2.3. Indirekt ELISA (iELISA)

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda üretilen rekombinant BoSA1 proteini, indirekt ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) için kullanılmıştır (Sevinç ve ark., 2015). Rekombinant BoSA1 (rBoSA1) antijenin ELISA pleytine (NEST Scientific Inc. USA) bağlanması ve örneklerin işlenmesi aşağıdaki adımlarla gerçekleştirilmiştir:

1. Pürifiye rBoSA1 karbonat bikarbonat tamponu (0,05 M Karbonat/Bikarbonat tamponu; 1,59 gr Na_2CO_3 + 2,93 gr $NaHCO_3$ 1000 ml distile su içerisinde çözdürülüp pH=9,6'ya ayarlandıktan sonra 4 ºC'de muhafaza edildi) ile 2 µg/ml oranında sulandırılmıştır.

2. ELISA pleytinin kuyucuklarına 100 µl pürifiye rBoSA1 damlatılarak +4°C'de bir gece bekletilmiştir.

3. +4°C'de bir gece inkübasyondan sonra plağın yüzeyi PBST (%0.05 Tween-20 + PBS; pH 7.4) ile bir kez yıkanmıştır.

4. Bloklama işlemi için her kuyucuğa %3 oranında yağsız süt tozu içeren PBST'den 100 µl eklenerek 37°C'de 1 saat bekletilmiş ve sonrasında bir kez PBST ile yıkanmıştır.

5. Yıkama işleminden sonra, %3'lük yağsız süt tozu ile 1:100 oranında sulandırılan serumlar kuyucuklara 100 µl eklenerek 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

6. İnkübasyondan sonra, PBST ile 3 kez yıkanmış ve sonrasında %3'lük yağsız süt tozu ile 1:1000 oranında sulandırılan sekonder antikor (horseradish peroxidase ile işaretli anti-koyun IgG-, Sigma-A3415, USA) her kuyucuğa 50 µl eklenerek 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

7. PBST ile 3 kez yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µl substrat (TMB) solüsyonu (Serva-37068, Heidelberg, Germany) ilave edilerek karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 5-10 dk bekletilmiştir.

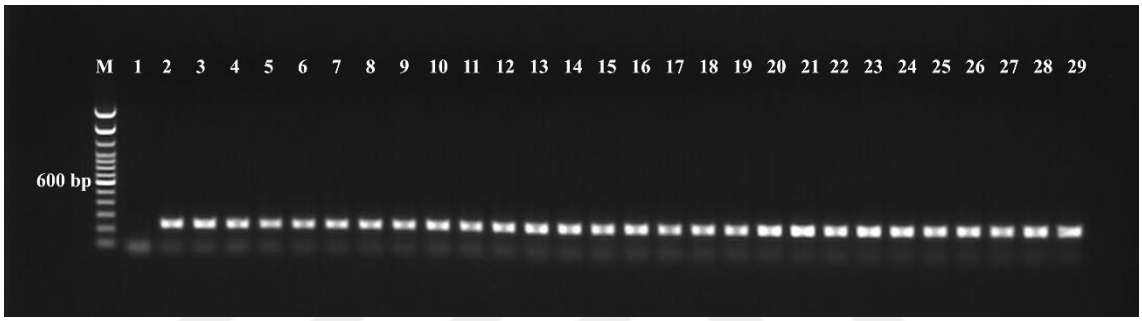
8. Reaksiyonu durdurmak için pleyt kuyucuklarına 1M sülfürik asit (H_2SO_4) eklenmiş ve 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır (ELx800 Absorbance Reader, BioTek Inc., USA).

4.3. İstatistiksel Analiz

Nested PCR ve ELISA sonuçlarının karşılaştırılması ve odaklardaki pozitiflik oranlarının değerlendirilmesi Pearson ChiSquare ($\chi 2$) testi ile yapılmıştır. $p<0,05$ bulunan değerler istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Bu testlerin yapılmasında SPSS 22.00 paket programı kullanılmıştır.

5. BULGULAR

Bağlar, Bismil, Çermik, Çınar ve Sur ilçelerinde 414 koyun öncelikle genomik DNA'nin kontrolü yönünden incelenmiş ve tüm örneklerde koyun *ovine integrin alpha M* geninin amplifiye olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3). Daha sonrasında genomik DNA ve serum örnekleri *B. ovis* yönünden nPCR ve iELISA ile incelenmiş ve sonuçların odaklara göre dağılımı Tablo 3'te verilmiştir.

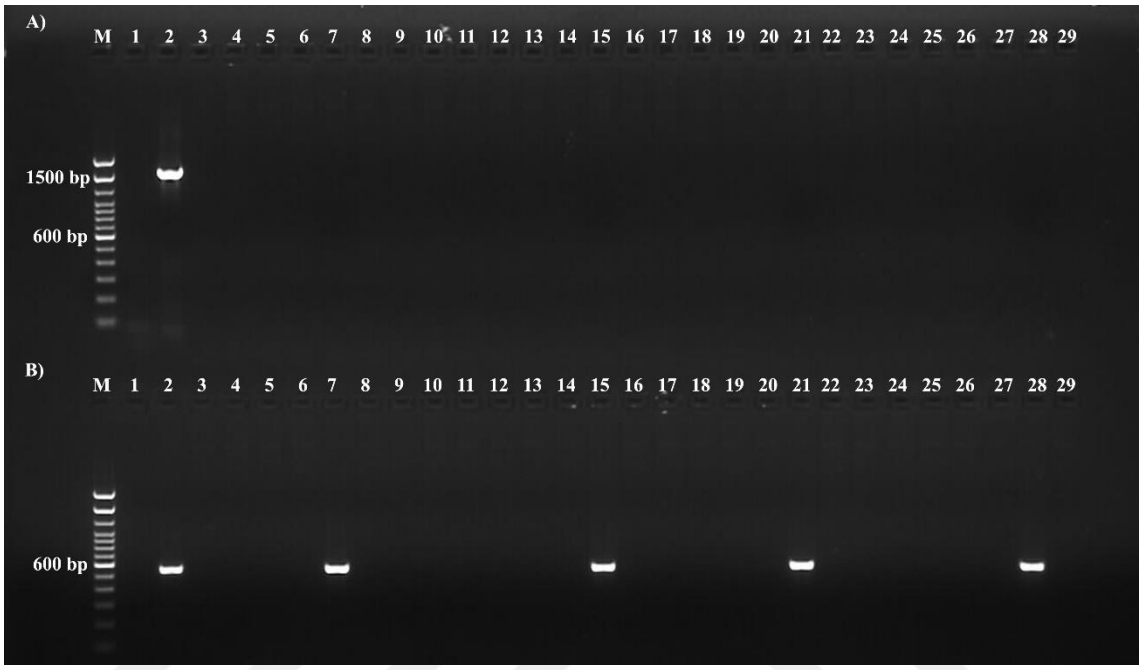


Şekil 3. Koyunlardan elde edilen genomik DNA'ların kontrolü amacıyla koyun ovine integrin alpha M genine ait PCR'in agaroz jel görüntüsü. (M: Marker; 1: Negatif kontrol; 2: Pozitif kontrol; 2-29: Saha örnekleri)

Tablo 3. Nested PCR ve iELISA sonuçlarının odaklara göre dağılımı.

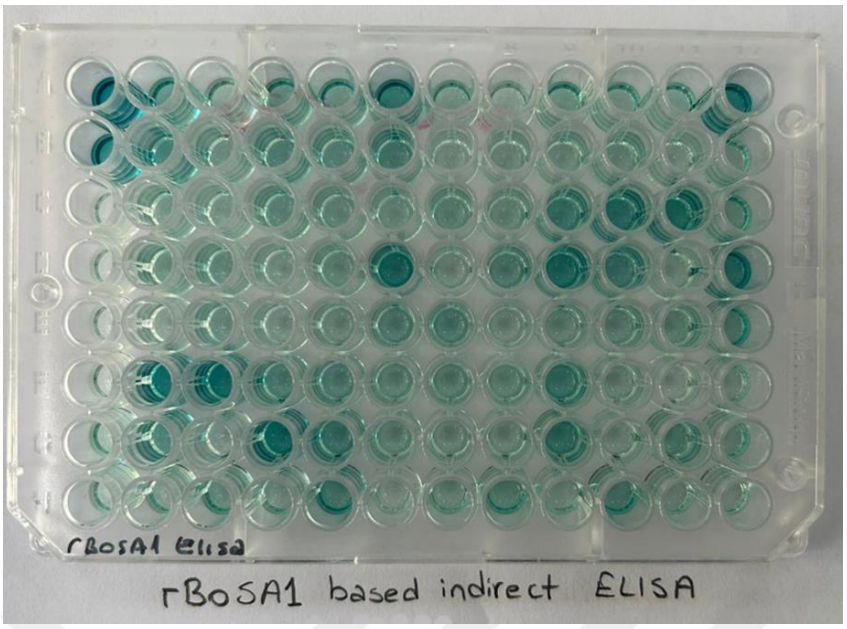
		nPCR		**iELISA**	
Odak	**n**	**+**	**-**	**+**	**-**
Bağlar	65	-	65	17 (%26,1)	48
Bismil	40	2 (%5)	38	18 (%45)	22
Çermik	33	-	33	6 (%18,2)	27
Çınar	142	4 (%2,8)	138	128 (%90,1)	14
Sur	134	2 (%1,5)	132	79 (%58,9)	55
Toplam	**414**	**8 (%1,9)**	**406**	**248 (%59,9)**	**166**

Tablo 3'ten anlaşılacağı üzere nPCR ile 414 koyunun 8'inde (%1,9) pozitiflik saptanmıştır. Nested PCR pozitiflik oranı Bismil'de %5, Çınar'da %2,8, Sur'da %1,5 olarak belirlenirken Bağlar ve Çermik ilçelerinde örneklerin tamamı negatif bulunmuştur (Şekil 4).



Şekil 4. Sahadan toplanan örneklerin nPCR agaroz jel görüntüsü. A) Nbab 1F-Nbab1R primerleri ile yapılan 1 PCR'a ait agaroz jel görüntüsü, B) BboF-BboR primerleri ile yapılan nPCR'a ait agaroz jel görüntüsü. (M: Marker; 1: Negatif kontrol; 2: Pozitif kontrol; 2

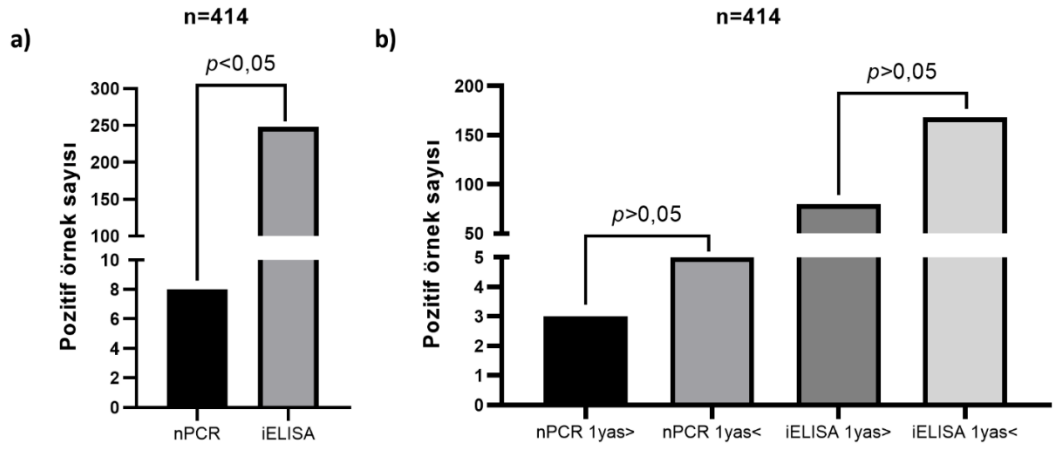
Indirekt ELISA ile 414 serum örneğinden 248'inin (%59,9) *B. ovis*'e karşı reaksiyon verdiği görülmüştür (Şekil 5). Serolojik olarak pozitiflik oranı en yüksek Çınar (%90,1), en düşük Çermik'te (%18,2) olduğu tespit edilmiştir .



Şekil 5. ELISA testinde rBoSA1'e karşı pozitif ve negatif reaksiyon veren serum örnekleri.

Nested PCR ile pozitif bulunan örneklerin tamamı iELISA ile de pozitif bulunmuş ve her iki testte elde edilen pozitiflik oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0,05) (Şekil 6a).

Ayrıca koyunlarda *B. ovis*'in nPCR ve iELISA ile yaygınlığı, hayvanların yaşları dikkate alınarak incelenmiş ve sonuçlar Tablo 4'te verilmiştir. Buradan anlaşılacağı üzere, *B. ovis* pozitiflik durumu ile hayvanların yaşı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p>0,05) (Şekil 6b).



Şekil 6. a) Nested PCR ve iELISA ile elde edilen pozitif örneklerin karşılaştırılması. b) Nested PCR ve iELISA ile elde edilen pozitiflik durumunun yaş ile ilişkisinin karşılaştırılması.

Tablo 4. Nested PCR ve iELISA ile elde edilen pozitiflik durumunun yaş ile ilişkisi.

		nPCR		**iELISA**	
	n	+	-	+	-
1 yas >	139	3 (%2,1)	136	80 (%57,5)	59
1 yas <	275	5 (%1,8)	270	168 (%61,1)	107
Toplam	**414**	**8 (%1,9)**	**406**	**248 (59,9)**	**166**

6. TARTIŞMA

Babesia ovis kaynaklı babesiosis, keneler tarafından koyunlara bulaşan ve küçükbaş hayvancılık endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olan hemolitik bir hastalıktır. *Babesia ovis,* coğrafi olarak oldukça geniş bir yayılım göstermektedir ve farklı bölgelerde yaygın olarak bulunmaktadır (Schnittger ve ark., 2022). Önceki raporlar, Doğu Avrupa, eski SSCB ülkeleri, İspanya, İtalya, Portekiz, Türkiye, Suriye, İsrail, Ürdün, İran, Irak, Nijerya, Gana, Somali, Orta ve Güney Amerika'da bu hemoprotozoanın varlığını göstermektedir (de Wall, 2000). Yeni epidemiyolojik ve klinik veriler, Bosna Hersek (Stevanović ve ark., 2022), Türkiye (Ceylan ve Sevinç, 2020), Mısır (Hussein ve ark., 2017), Filistin (Azmi ve ark., 2016), İran (Habibi ve ark., 2020), Pakistan (Iqbal ve ark., 2011) ve Irak'ta da (Renneker ve ark., 2013) koyunlarda kenelerle bulaşan bir hastalık olarak önemini doğrulamıştır. Ayrıca, Yunanistan (Theodoropoulos ve ark., 2006), İspanya (Nagore ve ark., 2004), İtalya (Savini ve ark., 1999) ve Portekiz (Horta ve ark., 2014) gibi Avrupa ülkelerinde de sağlıklı küçük ruminantlarda *B. ovis* enfeksiyonuna dair moleküler kanıtlar kaydedilmiştir. Afrika'da ise son moleküler çalışmalar, Nijerya (Adewumi ve ark., 2022), Uganda (Tumwebaze ve ark., 2020), Cezayir (Aouadi ve ark., 2017) ve Tunus'ta (Rjeibi ve ark., 2016) *B. ovis*'in varlığı doğrulanmıştır. Küba'da koyunlarda *B. ovis* olduğunu bildiren mikroskobik bir çalışma vardır ancak o tarihten buyana bu veri moleküler olarak desteklenmemiştir (Rodríguez ve ark., 1989).

Türkiye'de *B. ovis*'in yaygınlığını belirlemek amacıyla mikroskobik, serolojik ve moleküler yöntemlerin kullanıldığı birçok çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmaların sonuçlarına göre, *B. ovis*'in prevelansı mikroskobik yöntemlerle %0,5 ile %22,2

arasında, serolojik yöntemlerle %30,5 ile %80,2 arasında ve moleküler yöntemlerle %2,6 ile %21,4 arasında bildirilmiştir (Aydın ve Dumanlı 2019; Ceylan ve ark., 2021).

Diyarbakır'da yapılan çalışmalar ise *B. ovis*'in prevelansını mikroskobik, serolojik ve moleküler verilerle değerlendirmiştir. Buna göre, mikroskobik yöntemlerle %0,6 ile %2 arasında, serolojik yöntemlerle %20 ile %53 arasında ve moleküler yöntemlerle %3 olarak belirlenmiştir (Özer, 1993; Aktaş ve ark., 2007; Ceylan ve Sevinç, 2020). Bu verilerin ışığında, *B. ovis*'in Türkiye'deki prevalansının çeşitli faktörlere bağlı olarak önemli ölçüde değişebildiği görülmektedir. Özellikle, farklı yöntemlerin kullanılmasının sonuçlarda belirleyici olduğu ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda, ELISA ve PCR kombinasyonunun, *Babesia* kaynaklı enfeksiyonunun teşhisi konusunda ve epidemiyolojik çalışmalarda yüksek hassasiyet ve doğruluk gösteren güçlü bir araç olarak kabul edildiği bilinmektedir (Terkawi ve ark., 2011, 2012; Ibrahim ve ark., 2013; Guswanto ve ark., 2017). Bu çalışmada, koyunlarda *B. ovis*'in prevelansının belirlenmesinde hem serolojik yöntemlerle antikorların tespiti hem de moleküler yöntemlerle DNA'nın saptanması sağlanmıştır. Bu yaklaşımın, epidemiyolojik çalışmaların daha kesin sonuçlarla desteklenmesi açısından önemli olduğu görülmektedir (Terkawi ve ark., 2011, 2012; Ibrahim ve ark., 2013; Guswanto ve ark., 2017). Diyarbakır ilinde 5 farklı ilçede bulunan 12 odakta 414 koyundan toplanan kan numuneleri nPCR ve iELISA ile incelenmiş ve sırasıyla %1,9 ve %59,9 oranında pozitiflik saptanmıştır. Farklı coğrafyalarda *Theileria* ve *Babesia* türlerinin prevelanslarının belirlenmesinde PCR ve ELISA kombinasyonu birlikte kullanılmıştır. Meksika'da atlar üzerinde yapılan bir çalışmada, *B. caballi* ve *T. equi*'nin ELISA ile sırasıyla %55,7 ve %68,4, nPCR ile ise %7,8 ve %78,8 olarak belirlendiği görülmüştür. *Babesia caballi*'nin ELISA ile daha yüksek bulunmasının arkasındaki nedenler arasında parazitemi seviyelerinin dalgalanması ve bazı örneklerin nPCR tespit seviyelerinin

altında olabileceği, ayrıca etkenin elimine edilmesinden sonra spesifik antikorların uzun süre devam etmesi ve parazitin nadiren de olsa kapiller endotel hücrelerinde kümelenmesi gibi faktörler in etkili olabileceği belirtilmiştir (Salinas-Estrella ve ark., 2021). Venezuella'da atlar üzerinde yapılan benzer bir çalışmada *B. caballi* ELISA ile %23,2, PCR ile %4,4 oranında bildirilmiştir. Aynı çalışmada ilginç olarak *T. equi* ELISA ile %14, PCR ile %61,8 oranında bulunmuştur. Bu durum bazı hayvanların serum antikorları olmadan erken enfeksiyon nedeniyle olabileceği, ayrıca koruyucu antikorların daha az miktarda olması, bu parazitin konakçıdan temizlenmesinin nadir olduğu ve enfeksiyon aşamaları boyunca tespit edilebilir seviyelerde (dalgalanan parazitemi seviyelerine rağmen) kalma eğiliminden kaynaklı olabileceği vurgulanmıştır (Rosales ve ark. 2013). Mısır'da sığırlar üzerinde yapılan çalışmada *B. bigemina* prevalansı, nPCR ve ELISA kullanılarak sırasıyla %5,3 ve %10,6 iken, *B. bovis* için bu oranlar sırasıyla %4 ve %9,3 olarak belirlenmiştir. Mandalarda ise *B. bigemina* prevalansı nPCR ve ELISA ile sırasıyla %10,4 ve %15,6; *B. bovis* prevalansı ise %4,2 ve %11,5 olarak bulunmuştur (Ibrahim ve ark., 2013). Endonezya'da yapılan benzer bir çalışmada nPCR ve ELISA sonuçları *B. bovis* için %50,7, %69,8; *B. bigemina* için %19,1, %27,5 olarak bildirilmiştir (Guswanto ve ark., 2017). Tayland'da mandalar üzerinde yapılan bir çalışmada nPCR, ELISA ve IFAT teknikleri kullanılmış *B. bovis* için sırasıyla %11,2-%14,7-%16,8; *B. bigemina* için %3,6-%5,9-%5,6 oranlarında bildirilmiştir (Terkawi ve ark., 2011). Aynı teknikler kullanılarak Suriye'de sığırlarda yapılan çalışmada *B. bovis* için sırasıyla %9,2-%%15,5-%18,3; *B. bigemina* için %15,5-%18,8-%21.7 oranlarında bildirilmiştir (Terkawi ve ark., 2012). Yapılan çalışmalar, *Babesia* parazitlerinin serolojik prevalansının moleküler prevelanstan daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada bu bulguları destekler nitelikte serolojik prevalansın moleküler prevalanstan belirgin şekilde yüksek olduğunu göstermiştir.

Moleküler prevelansın düşük çıkmasında babesiosis'in tedavisinde kullanılan imidocarb dipropionatın bilinçsizce kullanılması rol oynayabilir. Bu ilacın yıllık tüketimiyle ilgili bir veri olmasa da gerek veteriner klinikleri ve gerekse hayvan yetiştiricileri ile yapılan görüşmelerde özellikle kenelerin aktif olduğu mevsimde sürünün gerisinde kalan, yüksek ateş ve hemoglobinuri gibi semptomlar gösteren koyunlara yoğun bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir (Sevinç ve Xuan, 2015a). Literatürde yapılan çalışmalar, imidocarb dipropionatın akut babesiosis'li kuzularda etkili olduğunu ve tedaviden kısa bir süre sonra parazitlerin eliminasyonunu sağladığını göstermektedir (Sevinç ve ark., 2007). Benzer şekilde, *B. ovis* ile enfekte edilen kuzuların imidocarb dipropionat ile tedavi sonrasında mikroskobik olarak negatif bulunduğu bildirilmiştir (Hashemi ve Fesharki, 1977). *Theileria equi* ile deneysel enfekte edilen atlarda yapılan bir başka çalışmada, moleküler yöntemlerle etkenlerin tedaviden sonraki 2. haftada saptanamadığı, ancak serolojik reaksiyonların 33. haftaya kadar devam ettiği gözlemlenmiştir (Grause ve ark., 2013). Bu bulgular, serolojik testlerin tedaviden sonra uzun süre duyarlı kalabileceğini ve moleküler testlere göre daha yüksek prevalanslar ortaya koyabileceğini düşündürebilir.

Babesia ovis ile deneysel enfeksiyondan sonra BoSA1 antijenine karşı serolojik reaksiyonun 75. güne kadar devam ettiği bilinmektedir (Sevinç ve ark., 2015b). Sandviç ELISA yöntemiyle bu antijenin, *B. ovis* ile enfekte *R. bursa* keneleri ile gerçekleştirilen deneysel enfeksiyondan sonraki 7. günden itibaren tespit edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *B. caballi*, *B. canis*, *B. gibsoni*, *Theileria equi* ve *T. annulata* dahil çeşitli piroplazm türleri ile enfekte olan hayvanlardan elde edilen serumlar ile çapraz reaksiyon gözlemlenmemiştir (Sevinç ve ark., 2023). Ancak, bu proteinin koyunlardan bulunan *Theileria* ve *Babesia* türleri ile çapraz reaksiyon gösterip göstermediği henüz bilinmemektedir.

Çalışmaya önceki sezonda babesiosis semptomları göstermiş olan sürülerin dahil edilmesi serolojik prevelansın yüksek çıkması buna bağlı olabilir ancak BoSA1 proteinine karşı serolojik reaksiyonun 1 yıl boyunca devam edip etmediği konusunda bir bilgi bulunmamaktadır.

Serolojik ve moleküler prevalans arasındaki farkın başka bir sebebi, *Babesia* parazitlerinin konaklarında dalgalı seyir göstermesine bağlı olabilir. Yapılan bir çalışmada, *B. bovis* ile deneysel olarak enfekte edilen sığırların antikor yanıtları, enfeksiyondan sonraki bir yıl boyunca düzenli olarak izlenmiş ve bu süre zarfında antikorların varlığı tespit edilmiştir. Ancak, aynı süre boyunca yapılan moleküler testlerde parazit varlığı dalgalanmalar göstermiştir (Chung ve ark., 2017). Bu dalgalanmalar, parazitlerin konak organizmada farklı evrelerde aktif olarak çoğalma ve kontrol altına alınma süreçlerini yansıtabilir. Dolayısıyla, serolojik testlerle tespit edilen antikor yanıtlarının sabit olmasına rağmen, moleküler testlerle parazit varlığında dalgalanmalar görülmesi, enfeksiyonun dinamik seyrini ve konak organizmanın tepkilerini göstermektedir. Bu nedenle, serolojik ve moleküler testlerin kombinasyonu, *Babesia* enfeksiyonlarının daha tam ve kesin bir şekilde değerlendirilmesini sağlar.

Sonuç olarak;

- *Babesia ovis*'in moleküler ve serolojik prevelansı Türkiye için aynı çalışmada ilk kez ortaya konmuştur.

- Diyarbakır ilinde koyunlarda yüksek bir serolojik prevelans belirlenmiş ancak moleküler prevelansın oldukça düşük olduğu görülmüştür.

- Serolojik ve moleküler prevelans arasındaki bu farkın özellikle kenelerin aktif olduğu dönemde babesiosis tedavisinde kullanılan imidocarb dipropionat'tin bilinçsizce ve kontrolsüzce kullanılmasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür.

- Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar koyun popülasyonlarında *B. ovis*'in yaygınlığını değerlendirirken moleküler ve serolojik yöntemlerin bir arada kullanılmasının önemini vurgulamıştır.

7. KAYNAKLAR

Adewumi, T.S., Takeet, M.I., Akande, F.A., Sonibare, A.O., Okpeku, M. (2022). "*Prevalence and Molecular Characterization of Babesia ovis Infecting Sheep in Nigeria."* Sustainability 14, 16974. https://doi.org/10.3390/su142416974

Aktaş, M., Altay, K., Dumanlı, N. (2005). "*Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of Babesia ovis infection in sheep and goats."* Vet. Parasitol. 133: 277-281. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.057

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: 797-802.

Aouadi, A.H., Leulmi, M., Boucheikhchoukh, A., Benakhla, D., Raoult, P., Parola. (2017). "*Molecular evidence of tick-borne hemoprotozoan-parasites (Theileria ovis and Babesia ovis) and bacteria in ticks and blood from small ruminants in Northern Algeria"* Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 50, pp. 34-39.

Aydın, L., Bakırcı, S. (2007). "*Geographical distribution of ticks in Turkey."* Parasitol. Res. ; 101(2): S163-S166.

Aydın, MF., Dumanlı, N. (2019). "*Tick-borne pathogens in small ruminants in Turkey: A systematic review."* Turk Vet J, 1(2): 74-83.

Azmi, K., Ereqat, S., Nasereddin, A., Al-Jawabreh, A., Baneth, G., Abdeen, Z. (2016). "*Molecular detection of Theileria, Babesia, and Hepatozoon spp. in ixodid ticks from Palestine Ticks"* Tick Borne Dis. 7, pp. 734-741.

Bose, R., Jacobson, R.H., Gale, K.R., Waltisbuhl, D.J., Wright, I.G. (1990). "*An improved ELISA for the detection of antibodies against Babesia bovis using either a native or a recombinant B. bovis antigen."* Parasitol. Res. 76, 648–652.

Carrique, J.J., Morales, G.J., Edelsten, M. (2000). "*Endemic instability for babesiosis and anaplasmosis in cattle in the Bolivian Chaco."* Vet. J. 160, 162–164.

Ceylan, O., Sevinç, F. (2020). "*Endemic instability of ovine babesiosis in Turkey: A country-wide sero-epidemiological study".* Vet. Parasitol.; 278:109034.

Ceylan, O., Xuan, X., Sevinç, F. (2021). "*Primary Tick-Borne Protozoan and Rickettsial Infections of Animals in Turkey*. Pathogens"; 10(2): 231.

Chung, CJ., Suarez, CE., Bandaranayaka-Mudiyanselage, CL., Bandaranayaka-Mudiyanselage, CB., Rzepka, J., Heiniger, TJ., Chung, G., Lee, SS., Adams, E., Yun, G., Waldron, SJ. *A.*(2017). *"Novel modified-indirect ELISA based on spherical body protein 4 for detecting antibody during acute and long-term infections with diverse Babesia bovis strains."* Parasit Vectors. 2017 Feb 13;10(1):77. doi: 10.1186/s13071-017-2016-9.

da Silva, J.B., André, M.R., da Fonseca, A.H., de Albuquerque Lopes, C.T, da Silva Lima, D.H., de Andrade, S.J., Oliveira, C.M., Barbosa, J.D. (2013). "*Molecular and serological prevalence of Babesia bovis and Babesia bigemina in water buffaloes in the north region of Brazil."* Vet. Parasitol. (2013) Nov 8;197(3-4):678-81. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.05.020. Epub (2013 Jun 2.)

De Wall, D.T. (2000). "*Global importance of piroplasmosis"* J. Protozool. Res., 10, pp. 106-127

Elmaz. O., Aras, G., Gokcay Y., Salman, C.B. (2015). "*Batı Akdeniz Küçükbaş Hayvancılık Çalıştayı Sonuç Raporu."* Antalya: T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Merkez Kütüphanesi.

Erster, O., Roth, A,,Wollkomirsky, R., Leibovich, B., Savitzky, I., Zamir, S., Molad, T., Shkap,V. (2016b)*." Quantitative analysis of Babesia ovis infection in sheep and ticks"* Vet. Parasitol. (221), pp 39-45.

Erster. O., Roth A., Wolkomirsky, R., leibovich, B., Savitzky, I., Shkap, V. (2016a). "*Transmission of Babesia ovis by different Rhipicephalus bursa developmental stages and infected blood injection*." Ticks and Tick-borne Diseases ; 7(1): 13–19.

Figueroa, J.V., Chieves, L.P., Johnson, G.S., Buening, G.M. (1993). "*Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of Babesia bigemina, Babesia bovis and Anaplasma marginale DNA in bovine blood."* Vet. Parasitol. 50, 69–81.

Friedhoff , KT. (1997). "*Tick-borne diseases of sheep and goats caused by Babesia, Theileria or Anaplasma spp."* Parassitologia; 39(2): 99– 109.

Göksu, K.(1967). "*Yerli koyunlarımızda Babesidae ve Theileridae'lerin epizootiolojik durumlarıyla biyolojilerine dair araştırmalar.*"Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları No:205, Ankara, Turkey

Grause, JF., Ueti, MW., Nelson, JT., Knowles, DP., Kappmeyer, LS., Bunn, TO. (2012). "*Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating Theileria equi from experimentally infected horses."* Vet J. 2013 Jun;196(3):541-6. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.10.025. Epub 2012 Nov 28.

Guan, G., Ma, M., Moreau E.,Liu J., Lu B., Bai Q.,Luo J.,Jorgensen W., Chauvin A.,Yin H. (2009). "*A new ovine Babesia species transmitted by Hyalomma anatolicum anatolicum*." Exp. Parasitol.; 122: 261–267.

Guswanto, A., Allamanda, P., Mariamah, ES., Sodirun S, Wibowo PE, Indrayani L, Nugroho RH, Wirata IK, Jannah N, Dias LP, Wirawan HP, Yanto R, Tuvshintulga B, Sivakumar T, Yokoyama N, Igarashi I. (2017). "*Molecular and serological detection of bovine babesiosis in Indonesia."* Parasit Vectors. 2017 Nov 6;10(1):550.

Habibi G., Sepahvand-Mohammadi E., Afshari A., Bozorgi S. (2020). "*Molecular detection of Theileria spp. and Babesia ovis Infection in Sheep in Baneh."* Iran Arch. Razi Inst., 75, pp. 289-296,

Hashemi-Fesharki, R. (1977). "*Studies on imidocarb dihydrochloride in experimental Babesia ovis infection in splenectomized lambs."* Br Vet J. (1977) Nov-Dec;133(6):609-14. doi: 10.1016/s0007-1935(17)33941-6.

Horta, S., Barreto, M.C., Pepe A., Campos, J., Oliva, A. (2014). "*Highly sensitive method for diagnosis of subclinical B. ovis infection Ticks"* Tick. Borne Dis., 5, pp. 902-906,

Hussein, N.M., Mohammed, E., Hassan, A., El-Dakhl, K. (2017). "*Distribution pattern of Babesia and Theileria species in sheep in Qena Province,"* Upper Egypt Arch. Parasitol., 1 pp. 1-4

Ibrahim, HM., Adjou Moumouni, P.F., Mohammed-Geba, K., Sheir, S.K., Hashem, IS., Cao, S., Terkawi, MA., Kamyingkird K, Nishikawa Y, Suzuki H, Xuan X. (2013). ''*Molecular and serological prevalence of Babesia bigemina and Babesia bovis in cattle and water buffalos under small-scale dairy farming in Beheira and Faiyum Provinces'' Egypt.* Vet Parasitol. 2013 Nov 15;198(1-2):187-92.

Iqbal, F., Fatima, M., Shahnawaz, S., Naeem, M., Shaikh, R., Ali, M., Shaikh, A., Aktaş, M., Ali, M.A.(2011). "*Study on the determination of risk factors associated with babesiosis and prevalence of Babesia sp., by PCR amplification, in small ruminants from Southern Punjab (Pakistan) Parasite",* 18 pp. 229-234,

Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., Schnittger, L. (2019). "*Babesia Life Cycle - When Phylogeny Meets Biology."* Trends Parasitol. ; 35(5): 356–368.

Jongejan, F., Uilenberg, G. (2004). "*The global importance of ticks."* Parasitology; 129: S3–S14.

Martins, T.M., Pedro, O.C., Caldeira, R.a., do Rosário, V.E., Neves, L., Domingos, A. (2008). "*Detection of bovine babesiosis in Mozambique by a novel seminested hot-start PCR method*."Vet. Parasitol. 153, 225–230.

Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacamu, G.J., Canto, G. (2012). "*Current advances in detection and treatment of babesiosis."* Curr. Med. Chem, 19,1504–1518.

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 a sheep population from Northern Spain"* Int. J. Parasitol., 34, pp. 1059-1067.

Oliveira-Sequeira, T.C.G., Oliveira, M.C.S., Araujo, J.P., Amarante, A.F.T. (2005). "*PCR-based detection of Babesia bovis and Babesia bigemina in their natural host Boophilus microplus and cattle."* Int. J. Parasitol. 35, 105–111.

Oosthuizen, M.C., Zweygarth, E.,Collins, N.E., Troskie, M., Penzhorn, B.L. (2008). "*Identification of a novel Babesia sp. from a sable antelope (Hippotragus niger Harris, 1838)."* J. Clin. Microbiol. 46, 2247–2251.

Özer, E., Erdoğmuş, S.Z., Köroğlu, E. (1993). "*Malatya ve Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kan parazitleri ve yayılışları."* Turkish J Vet Anim Sci, 17: 209-215.

Özkoç, Ü. (1979). "*Koyunlarda B. ovis enfeksiyonunun Indirekt Floresan Antikor Tekniği ile serolojik teşhisi üzerinde araştırma."* Pendik Vet Mikrobiyol Enst Derg 11:70-83.

Özübek, S., Bastos, R. G., Alzan, H. F., Inci, A., Aktaş, M., & Suarez, C. E. (2020). "*Bovine babesiosis in Turkey: Impact, current gaps, and opportunities for intervention."* Pathogens; 9(12), 1041.

Özübek, S., Uluceşme, M.C., and Aktaş, M. (2023). "*Discovery of a Novel Species Infecting Goats: Morphological and Molecular Characterization of Babesia aktasi n. Sp."* Pathogens 12, 113.

Renneker, S., Abdo J., Bakheit M.A., Kullmann B., Beyer D., Ahmed J., Seitzer U. (2013). "*Coinfection of sheep with Anaplasma, Theileria and Babesia species in the Kurdistan Region Iraq Transbound."* Emerg. Dis., 60 (Suppl 2), pp. 113-118,

Rjeibi ,M.R., Darghouth M.A., Gharbi M. (2016). "*Prevalence of Theileria and Babesia species in Tunisian sheep"* Onderstepoort J. Vet. Res., 83, p. a1040,

Rodríguez, O.N., Espaine, L., Rivas, A., Rodriguez, P. (1989). "*Epidemiology of cattle diseases caused by haemoparasites in Cuba."* Rev. Cuba. Cienc. Vet., 20, 37–56.

Rosales, R., Rangel-Rivas, A., Escalona, A., Jordan, L.S., Gonzatti, M.I., Aso, P.M., Perrone, T., Silva-Iturriza, A., Mijares, A. (2013). ''*Detection of Theileria equi and Babesia caballi infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR*'' Vet. Parasitol. 1;196(1-2):37-43.

Salinas-Estrella, E., Ueti, M.W., Lobanov, V.A., Castillo-Payro´ E, Lizcano-Mata A., Badilla, C., Martı´nez-Iba´ñez, F., Mosqueda J.(2022). "*Serological and molecular detection of Babesia caballi and Theileria equi in Mexico: A prospective study." PLoS ONE* 17(3): e0264998. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264998

Savini, G., Conte, A., Semproni, G., Scaramozzino, P.(1999). "*Tick-borne diseases in ruminants of Central and Southern Italy: epidemiology and case reports"* Parassitologia, 41 (Suppl 1), pp. 95-100

Schnittger, L., Ganzinelli, S., Bhoora, R., Omondi, D., Nijhof, A.M., and Florin-Christensen, M. (2022). "*The Piroplasmida Babesia, Cytauxzoon, and Theileria in farmand companion animals: Species compilation, molecular phylogeny, and evolutionaryinsights."* Parasitol. Res. 121, 1207–1245.

Schnittger, L., Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M., Morrison, D.A. (2012). "*Babesia: a world emerging."* Infectious Genetic and Evoluation ; 12: 1788-1809.

Sevinç, F., Cao, S., Xuan, X., Sevinc, M., and Ceylan, O. (2015b). "*Identification and expression of Babesia ovis secreted antigen 1 and an evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay."* J. Clin. Microbiol. 53 (5), 1531–1536. doi: 10.1128/JCM.03219-14

Sevinç, F., Sevinç, M., Ekici, O.D., Yıldız, R., Işık, N., Aydoğdu, U. (2013). "*Babesia ovis infections: detailed clinical and laboratory observations in the pre- and post-treatment periods of 97 field cases."* Vet. Parasitol.; 191: 35–43.

Sevinç, F., Turgut, K., Sevinc, M., Ekici, O.D., Coskun, A., Koc, Y., Erol, M., Ica, A. (2007). "*Therapeutic and prophylactic efficacy of imidocarb dipropionate on experimental Babesia ovis infection of lambs*." Vet. Parasitol. 149 (1-2), 65-71.

Sevinç, F., Xuan, X. (2015a). "*Major tick-borne parasitic diseases of animals: A frame of references in Turkey." Eurasian* J Vet Sci. 31 (3), 132-142.

Sevinç, F., Zhou, M., Cao, S., Ceylan, O., Ulucesme, MC., Özübek, S., Aktas, M., and Xuan, X .(2023). "*Babesia ovis secreted antigen-1 is a diagnostic marker during the active Babesia ovis infections in sheep."* Front. Cell. Infect. Microbiol. 13:1238369. doi: 10.3389/fcimb.2023.1238369

Stevanović, O., Radalj, A., Subić, I., Jovanović, NM., Sladojević, Ž., Amović, M., Zuko, A., Nedić, D., Ilić, T. (2022). "*The presence of malignant ovine babesiosis in Bosnia and Herzegovina indicates a possible emerging risk for Balkan region."* Comp Immunol Microbiol Infect Dis. (2022 Nov-Dec);90-91:101893.

Şaki, C.E., Özer, E., Aytekin, Ö. (2008). Koyun-Keçi Kenelerine Karşı Saha ve Laboratuar Şartlarında% 1'lik Flumethrin (Flutick® PO)'in Etkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 22(5), 279-281.

Terkawi, MA., Alhasan, H., Huyen, NX., Sabagh, A., Awier, K., Cao, S., Goo, YK., Aboge, G., Yokoyama, N., Nishikawa, Y., Kalb-Allouz, AK., Tabbaa, D., Igarashi, I., Xuan, X. (2012). "*Molecular and serological prevalence of Babesia bovis and Babesia bigemina in cattle from central region of Syria."* Vet Parasitol. 8;187(1-2):307-11.

Terkawi, MA., Huyen, NX., Shinuo, C., Inpankaew, T., Maklon, K., Aboulaila, M., Ueno, A., Goo, YK., Yokoyama, N., Jittapalapong, S., Xuan, X., Igarashi, I. (2011). "*Molecular and serological prevalence of Babesia bovis and Babesia bigemina in water buffaloes in the northeast region of Thailand*." Vet Parasitol. 10;178(3-4):201-7.

Theodoropoulos, G., Gazouli, M., Ikonomopoulos, J.A., Kantzoura, V., Kominakis, A. (2006). "*Determination of prevalence and risk factors of infection with Babesia in small ruminants from Greece by polymerase chain reaction amplification"* Vet. Parasitol., 135, pp. 99-104,

Toprak, Z.F., Öztürkmen, G., Yılmaz, S., Dursun, F., Bayar, G., Em, A., Hamidi, N. (2009). *Diyarbakır Kent Merkezi İçin Sıcaklık Verilerinin İstatistiksel Analizi, İklim Değişikliği ve Çevre.* 1 (2):49-74

Tumwebaze, M.A., Byamukama, B., Tayebwa, D.S., Byaruhanga, J., Angwe, M.K., Galon, E.M., Liu M., Lee S.-H., Ringo A.E., Adjou Moumouni, P.F., Li J., Li Y., Ji S., Vudriko P., Xuan X. (2020). "*First molecular detection of Babesia ovis, Theileria spp., Anaplasma spp., and Ehrlichia ruminantium in goats from Western Uganda"* Pathogens, 9.

TÜİK-Hayvancılık üretim istatistikleri (2023).https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-2023

Walker, J.B., Keirans, J.E., Horak, I.G. (2000). "*The genus* Rhipicephalus *(Acari, Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world."* Cambridge: Cambridge University Press. 643 p.

Yeruham, I., Hadani, A., Galker, F. (1998). *"Some epizootiological and clinical aspects of ovine babesiosis caused by Babesia ovis"*, Vet. Parasitol., 74, 153–163.