

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**KAYSERİ'NİN DEVELİ VE YAHYALI YÖRELERİNDEKİ
SIĞIRLARDA ANAPLASMA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER
PREVALANSI VE KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan
Vet. Hek. Mustafa Hulusi ÖZKAN**

**Danışman
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

Yüksek Lisans Tezi

**Ocak 2025
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**KAYSERİ'NİN DEVELİ VE YAHYALI YÖRELERİNDEKİ
SIĞIRLARDA ANAPLASMA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER
PREVALANSI VE KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan
Vet. Hek. Mustafa Hulusi ÖZKAN**

**Danışman
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2023-13432 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2025
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: Vet. Hek. Mustafa Hulusi ÖZKAN

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Kayseri’nin Develi ve Yahyalı Yörelerindeki Sığırlarda *Anaplasma* Türlerinin Moleküler Prevalansı ve Karakterizasyonu”, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Vet. Hek. Mustafa Hulusi ÖZKAN

Danışman

Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Abdullah İNCİ

KABUL VE ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM danışmanlığında **Kayseri'nin Develi ve Yahyalı Yörelerindeki Sığırlarda *Anaplasma* Türlerinin Moleküler Prevalansı ve Karakterizasyonu**”, konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veterinerlik Parazitolojisi** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

27/01/2025

JÜRİ :

İmza

Danışman: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

Üye: Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Üye: Prof. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

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

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

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

Parazitoloji Anabilim Dalı'nda çalıŐmaya başladığım günden bu yana desteğini gördüğüm değerli hocalarım ERÜ Veteriner Fakóltesi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Abdullah İNCİ ile Parazitoloji Anabilim Dalı doktora öğrencileri Alina Denis KIZGIN, Ahsen Meliha TOROSLU, Batuhan AŐkım ARSLANHAN ile Samba Deguene DİOP'a ve TYL-2023-13432 kodlu proje ile çalıŐmaya destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalıŐmalarımın her aŐamasında birçok fedakârlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan aileme teşekkürü borç bilirim.

KAYSERİ'NİN DEVELİ VE YAHYALI YÖRELERİNDEKİ SIĞIRLARDA ANAPLASMA TÜRLERİN MOLEKÜLER PREVALANSI VE KARAKTERİZASYONU

Mustafa Hulusi ÖZKAN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2024
Danışman: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

ÖZET

Bu çalışma, Kayseri ilinin Develi ve Yahyalı ilçelerindeki sığırlarda *Anaplasma* türlerinin varlığını, prevalansını ve genetik çeşitliliğini araştırmak amacıyla yürütülmüştür. Toplam 150 sığır kanı örneği mikroskopik ve moleküler yöntemlerle incelenmiştir. Mikroskopik incelemede %2,66 oranında *Anaplasma* spp. tespit edilirken, nested PCR ve sekans analizi ile bu oran %8,00 olarak belirlenmiştir. Moleküler analizler sonucunda örneklerin 8'inin *A. centrale*, 4'ünün ise *A. marginale* olduğu tespit edilmiştir.

Yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde, enfeksiyon oranlarının yaşla birlikte arttığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,01$). En yüksek prevalans 3 yaşından büyük hayvanlarda tespit edilmiştir (%22,2). Cinsiyet açısından dişi ve erkek hayvanlar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Filogenetik analiz, Türkiye izolatlarının global popülasyonla genetik olarak benzer olduğunu göstermiştir. *A. centrale* AcenKYS1 izolatının diğer *A. centrale* sekansları ile tamamen identik olduğu, *A. marginale* AmarKYS1 izolatının ise diğer *A. marginale* sekansları ile yüksek benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu bulgular ışığında, bölgedeki anaplasmosis kontrolü için yaşa bağlı risk faktörlerini dikkate alan stratejiler geliştirilmesi, düzenli tarama programlarının uygulanması ve etkin vektör kontrolü önem arz etmektedir. Ayrıca, Türkiye'nin farklı bölgelerinde daha kapsamlı moleküler epidemiyolojik çalışmaların yapılması da önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: Anaplasmosis, Sığır, Kayseri, Prevalans, Filogenetik Karakterizasyon

MOLECULAR PREVALENCE AND CHARACTERIZATION OF *ANAPLASMA* SPECIES IN CATTLE IN THE DEVELI AND YAHYALI DISTRICTS OF KAYSERI

Mustafa Hulusi ÖZKAN

Erciyes University, Graduate School of Health Science
Department of Veterinary Parasitology
Master Thesis, January 2024
Supervisor: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the presence, prevalence, and genetic diversity of *Anaplasma* species in cattle in the Develi and Yahyalı districts of Kayseri province. A total of 150 cattle blood samples were examined using microscopic and molecular methods. While microscopic examination detected *Anaplasma* spp. at a rate of 2.66%, nested PCR and sequence analysis determined this rate to be 8.00%. Molecular analyses revealed that 8 of the samples were *A. centrale* and 4 were *A. marginale*. When evaluated according to age groups, it was observed that infection rates increased with age and this difference was statistically significant ($p < 0.01$). The highest prevalence was detected in animals older than 3 years (22.2%). No significant difference was observed between female and male animals in terms of gender ($p > 0.05$). Phylogenetic analysis showed that Turkish isolates were genetically similar to the global population. It was determined that the *A. centrale* AcenKYS1 isolate was completely identical to other *A. centrale* sequences, while the *A. marginale* AmarKYS1 isolate showed high similarity to other *A. marginale* sequences.

In light of these findings, it is important to develop strategies that take into account age-related risk factors for anaplasmosis control in the region, implement regular screening programs, and establish effective vector control. Additionally, it is recommended to conduct more comprehensive molecular epidemiological studies in different regions of Türkiye.

Keywords: Anaplasmosis, Cattle, Kayseri, Prevalence, Phylogenetic Characterization

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Sığırlarda <i>Anaplasma</i> Türlerinin Taksonomisi ve Morfolojisi.....	3
2.2 Sığırlarda <i>Anaplasma</i> Türlerinin Epidemiyolojisi.....	5
2.2.1 Genel Epidemiyolojik Özellikler ve Bulaşma Yolları.....	5
2.2.2 Dünyadaki Durum.....	6
2.2.3 Türkiye'deki Durum.....	7
2.3 Sığırlarda Anaplasmosis'in Teşhis ve Tedavisi.....	9
2.3.1 Teşhis.....	9
2.3.2 Tedavi, Kontrol ve Profilaksi.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1 Çalışma Sahası ve Sığırlardan Kan Örneklerinin Toplanması.....	13
3.2 Genomik DNA Ekstraksiyonu ve 16S rRNA Gen Bölgesi PCR Analizleri.....	14
3.3 Sekans ve Filogenetik Analizler.....	17
3.4 İstatistik Analizler.....	18
4. BULGULAR.....	19
4.1 Mikroskopik Analiz Bulguları.....	19
4.2 Nested PCR ve Sekans Analizi Bulguları.....	20

4.3 Filogenetik Analizi Bulguları	23
4.4 <i>Anaplasma</i> Türlerinin Prevalansı ve İstatistiksel Analiz Bulguları.....	25
5. TARTIŞMA.....	28
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	33
7. KAYNAKLAR.....	34
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	



KISALTMALAR VE SİMGELER

bp	: Baz çifti
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
gDNA	: Genomik DNA
HKY	: Hasegawa-Kishino-Yano
IFAT	: İndirekt Floresan Antikor Testi
Mbp	: Megabaz çifti
mL	: Mililitre
msp	: Major surface protein
OMP	: Dış membran proteini
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	: Kantitatif gerçek zamanlı PCR
rRNA	: Ribozomal RNA
spp.	: Türler
μ L	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre

TABLULAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1.	Kayseri yöresinde sığırlardan toplanan örnek sayılarının bölge, yaş ve cinsiyete göre dağılımı.....	14
Tablo 3.2.	PCR analizinde kullanılan oligonükleotid primerler	16
Tablo 4.1.	Çalışmada karakterize edilen <i>Anaplasma</i> izolatlarının sekanslanan 16S rRNA gen bölgelerinin hizalama analizine göre benzerlik matrisleri	22
Tablo 4.2.	AmarKYS1 genotipinin blast analizi sonrasında GenBank veri tabanında eşleştiği referans <i>A. marginale</i> kayıtları.	22
Tablo 4.3.	AcenKYS1 genotipinin blast analizi sonrasında GenBank veri tabanında eşleştiği referans <i>A. centrale</i> kayıtları.....	22
Tablo 4.4.	Kayseri ilinin Develi ve Yahyalı ilçelerindeki sığırlarda <i>Anaplasma marginale</i> ve <i>A. centrale</i> prevalansının bölge, yaş ve cinsiyet gruplarına göre dağılımı ve istatistiksel analizi.....	26

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 4.1.** Enfekte sığır perifer kan frotisinde *A. centrale* (Orijinal)..... 19
- Şekil 4.2.** Enfekte sığır perifer kan frotisinde *A. marginale* (Orijinal)..... 20
- Şekil 4.3.** *Anaplasma/Ehrlichia* 16S rRNA geninin hipervariable V1 bölgesini amplifiye eden spesifik primerlerle nested PCR analizi sonucunda belirlenen hedef büyüklükte (~490 bp) ampliconların agaroz jel üzerinde görünümü. 21
- Şekil 4.4.** Çalışmada karakterize edilen *Anaplasma* izolatlarının sekanslanan 16S rRNA gen bölgelerinin hizalama analizi sonrasında belirlenen nükleotid farklılıkları..... 21
- Şekil 4.5.** *Anaplasma marginale* ve *A. centrale* izolatlarının 16S rRNA gen bölgesinin 426 bp'lik kısmına dayalı Maximum Likelihood filogenetik ağacı. 24
- Şekil 4.6.** Örneklem bölgelerine göre *Anaplasma* enfeksiyonlarının % dağılım grafiği 27
- Şekil 4.7.** Yaş gruplarına göre *Anaplasma* enfeksiyonlarının % dağılım grafiği..... 27
- Şekil 4.8.** Cinsiyete göre *Anaplasma* enfeksiyonlarının % dağılım grafiği 28

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hayvan hastalıkları, özellikle de kene kaynaklı hastalıklar, hayvan yetiştiricileri için büyük zorluklar oluşturmaktadır. Kene kaynaklı hastalıklar küresel sağlık için ciddi bir sorundur ve bunlar arasında anaplasmosis önemli bir yer tutmaktadır. Anaplasmosis, sığırlarda çeşitli kene türleri ile taşınan riketsiyal patojen *Anaplasma* türlerinin neden olduğu bulaşıcı bir paraziter hastalıktır. Bu hastalık, tropikal ve subtropikal bölgelerde ilerleyici hemolitik anemiye ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Kocan ve ark., 2010).

Anaplasmosis, süt ve et üretim sistemlerinde ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu kayıplar, kilo kaybı, süt üretiminde azalma, düşüklükler, tedavi maliyetleri ve artan ölüm oranı gibi çeşitli parametrelerle ölçülmektedir. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri'nde anaplasmosis kaynaklı yıllık ekonomik kaybın 300 milyon doları aştığı tahmin edilmektedir (Aubry ve Geale, 2011).

Türkiye'de, özellikle Kayseri yöresinde, başta *Hyalomma* türleri olmak üzere çeşitli kene türleri yaygın olarak görülmektedir. Bu keneler, *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* gibi patojenleri taşıyarak büyükbaş hayvan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Kayseri'nin Develi ilçesinde 67153 adet, Yahyalı ilçesinde ise 18000 adet sığır cinsi hayvan bulunması, bu bölgede anaplasmosis'in potansiyel etkisinin büyüklüğünü göstermektedir.

Anaplasmosis'in kontrolü ve mücadelesi için, hastalığa yol açan *Anaplasma* türleri üzerine epidemiyolojik saha ve surveyans çalışmaları büyük önem taşımaktadır. Ancak, Türkiye'de ve özellikle Kayseri bölgesinde *Anaplasma* türlerinin yaygınlığı, dağılımı ve epidemiyolojik profili hakkında yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu bilgi eksikliği, hastalığın etkili kontrolünü ve yönetimini zorlaştırmaktadır.

Bu tez çalışmasında, sığır yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı ve *Hyalomma* türlerinin sık görüldüğü Kayseri'nin Develi ve Yahyalı bölgelerindeki sığırlarda *Anaplasma* türlerinin moleküler olarak araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında:

1. *Anaplasma* türlerinin prevalansının belirlenmesi,
2. Epidemiyolojik özgün verilerin elde edilmesi,
3. Belirlenen izolatların moleküler tür teşhislerinin yapılması,
4. İzolatların filogenetik karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Sığırlarda *Anaplasma* Türlerinin Taksonomisi ve Morfolojisi

Anaplasma türleri, Rickettsiales takımı ve Anaplasmataceae ailesine ait obligat hücre içi bakterilerdir (Dumler ve ark., 2001). Bu cins, tarihsel süreçte virüslerden protozoonlara kadar çeşitli şekillerde yanlış sınıflandırılmıştır. 2001 yılında yapılan kapsamlı bir taksonomik yeniden sınıflandırma, genetik analizlere dayanarak *Anaplasma* türlerinin sistematığına önemli katkılar sağlamıştır (Dumler ve ark., 2001).

Güncel sınıflandırmaya göre *Anaplasma* cinsi şu türleri içermektedir (Hove ve ark., 2018):

1. *A. marginale* (tip tür)
2. *A. centrale*
3. *A. ovis*
4. *A. bovis*
5. *A. phagocytophilum*
6. *A. platys*
7. *A. caudatum*

Ayrıca henüz resmi olarak tanımlanmamış *A. capra* ve *Anaplasma* sp. (Omatjenne) türleri de bulunmaktadır (Hove ve ark., 2018). Bu sınıflandırma, önceki sistematığe göre önemli değişiklikler içermektedir. Örneğin, *A. phagocytophilum*, *A. bovis* ve *A. platys* daha önce Ehrlichia cinsinde yer alırken, genetik analizler sonucunda *Anaplasma* cinsine dahil edilmiştir (Dumler ve ark., 2001).

A. marginale, sığırlarda anaplazmozise neden olan en yaygın türdür ve dünya çapında altı kıtada bulunmaktadır (Kocan ve ark., 2010). Bu tür ilk olarak 1910 yılında Güney Afrika'da Sir Arnold Theiler tarafından tanımlanmıştır (Kocan ve ark., 2010). *A. centrale* ise genellikle daha hafif seyreden bir hastalığa neden olur ve *A. marginale*'ye karşı çapraz koruma sağladığı için 1910'dan beri canlı aşı olarak kullanılmaktadır (Kocan ve ark., 2010).

Morfolojik olarak, *Anaplasma* türleri eritrositlerin içinde zarla çevrili, kokoid yapıda mikroorganizmalardır. *A. marginale*, eritrositlerin kenarında yerleşim gösteren 0.3-1.0 µm çapında yapılar olarak gözlenir (Kocan ve ark., 2010). Bu karakteristik yerleşim, türün adının "marjinal" anlamına gelen "marginale" olarak belirlenmesine neden olmuştur. *A. centrale* ise adından da anlaşılacağı gibi eritrositlerin merkezine yakın konumlanır ve bu özelliği ile *A. marginale*'den ayrılır (Aubry ve Geale, 2011).

Yakın zamanda yapılan genetik karakterizasyon çalışmaları, *A. marginale* ve *A. centrale*'nin ayrı türler olduğunu doğrulamıştır (Hove ve ark., 2018). 16S rRNA geni, groEL ve msp4 sekans analizleri, *A. centrale*'nin *A. marginale*'den tutarlı bir şekilde ayrı bir klad oluşturduğunu göstermiştir (Hove ve ark., 2018). Bu genetik farklılıklar, morfolojik farklılıklar ve Msp1a/Msp1aS gen yapısındaki farklılıklarla birlikte değerlendirildiğinde, *A. centrale*'nin ayrı bir tür olduğu sonucuna varılmıştır (Hove ve ark., 2018).

Anaplasma türlerinin genom yapıları da önemli bilgiler sağlamaktadır. *A. marginale* St. Maries suşunun tam genom dizilimi 2005 yılında tamamlanmış ve 1.197 Mbp büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir (Brayton ve ark., 2005). *A. centrale* İsrail suşunun genomu ise 1.206 Mbp büyüklüğündedir (Herndon ve ark., 2010). Bu genomik çalışmalar, türler arasındaki genetik farklılıkları ve evrimsel ilişkileri anlamada önemli rol oynamaktadır.

Anaplasma türlerinin taksonomisi ve morfolojisi hakkındaki bilgiler, bu patojenlerin teşhis, tedavi ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde kritik öneme sahiptir. Özellikle türler arasındaki genetik ve yapısal farklılıkların anlaşılması, spesifik tanı testlerinin ve aşuların geliştirilmesine katkı sağlamaktadır. Gelecekteki araştırmalar, *Anaplasma*

türlerinin moleküler karakterizasyonunu daha da derinleştirerek, bu patojenlerin epidemiyolojisi ve patogenezi hakkında daha fazla bilgi edinilmesini sağlayacaktır.

2.2 Sığırlarda *Anaplasma* Türlerinin Epidemiyolojisi

2.2.1 Genel Epidemiyolojik Özellikler ve Bulaşma Yolları

Kene Kaynaklı Bulaşma:

Anaplazmozis'in başlıca bulaşma yolu kenelerdir. Dünya genelinde 20'den fazla kene türünün *Anaplasma* türlerini taşıdığı bilinmektedir (Kocan ve ark., 2010). En önemli vektörler arasında *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus*, *Dermacentor* spp. ve *Ixodes ricinus* yer almaktadır (Zivkovic ve ark., 2007). Türkiye'de ise *R. turanicus* ve *R. bursa* önemli vektörler olarak bildirilmiştir (Aktaş ve Özübek, 2015).

Keneler, *Anaplasma*'yı transstadial olarak (bir yaşam evresinden diğerine) ve bazen de transovarial olarak (dişi keneden yumurtaya) aktarabilirler. Enfekte keneler, sığırları kan emerken patojeni bulaştırır (Kocan ve ark., 2010). Güney Afrika'da yapılan çalışmalarda, *R. decoloratus*, *R. microplus* ve *R. simus* türlerinin *A. marginale*'yi transstadial olarak taşıdığı gösterilmiştir. Ayrıca, *R. appendiculatus*'un *A. centrale*'yi taşıyabileceği bildirilmiştir, ancak bu durumun deneysel çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.

Diğer Bulaşma Yolları:

a) Mekanik Bulaşma: Kontamine enjektör, cerrahi aletler veya kan nakli ile bulaşma gerçekleşebilir (Aubry ve Geale, 2011). Bu bulaşma yolu, özellikle endemik bölgelerde önem taşımaktadır ve hastalığın kontrolünde dikkat edilmesi gereken bir noktadır.

b) İntrauterin Bulaşma: Gebeliğin son trimesterinde fetüse bulaşma olabilir (Kocan ve ark., 2010). Bu durum, doğan buzağuların enfekte olarak dünyaya gelmesine ve hastalığın yayılmasına katkıda bulunabilir.

c) Sığır Sinekleri: *Tabanus* spp. ve *Stomoxys calcitrans* gibi kan emici sineklerin mekanik vektör olarak rol oynadığı bildirilmiştir (Zivkovic ve ark., 2007). Bu sinekler,

enfekte hayvanlardan aldıkları kanı diğer hayvanlara taşıyarak hastalığın yayılmasına neden olabilirler.

Epidemiyolojik açıdan önemli bir nokta da, iyileşen hayvanların yaşam boyu taşıyıcı kalabilmeleridir. Bu durum, hastalığın endemik bölgelerde sürekli olarak bulunmasına katkıda bulunur (Kocan ve ark., 2010). Taşıyıcı hayvanlar, klinik belirti göstermeden enfeksiyonu sürdürebilir ve keneler aracılığıyla diğer hayvanlara bulaştırabilirler.

Yaban Hayatının Rolü:

Yaban hayatının *Anaplasma* türlerinin epidemiyolojisindeki rolü tam olarak anlaşılammıştır. Ancak, birçok yaban hayvanı türünün *Anaplasma* türleri için rezervuar konakçı olabileceği düşünülmektedir. Güney Afrika'da yapılan çalışmalarda, bazı antilop türlerinin (örneğin, blesbok, common duiker ve black wildebeest) *A. marginale* ve *A. centrale* ile enfekte olabileceği gösterilmiştir. Bu enfeksiyonlar genellikle subklinik seyretmektedir, ancak yaban hayvanları patojeni kenelere aktararak hastalığın yayılmasında rol oynayabilir (Estrada-Peña ve ark., 2012).

İklim Değişikliğinin Etkisi:

İklim değişikliği, anaplazmozis epidemiyolojisini etkileyebilecek önemli bir faktördür. Sıcaklık artışı ve yağış rejimindeki değişiklikler, kene popülasyonlarının dağılımını ve aktivitesini etkileyebilir. Bu durum, hastalığın yeni bölgelere yayılmasına veya mevcut endemik bölgelerde prevalansın artmasına neden olabilir. Örneğin, Avrupa'da iklim değişikliği nedeniyle *R. microplus*'un yayılım alanının genişlediği ve buna bağlı olarak anaplazmozis riskinin arttığı bildirilmiştir (Estrada-Peña ve ark., 2012).

2.2.2 Dünyadaki Durum

Anaplasma türleri, özellikle *A. marginale*, dünya genelinde sığır yetiştiriciliğini etkileyen en yaygın kene kaynaklı patojenlerden biridir. *A. marginale* altı kıtada da bulunmakta olup, tropikal ve subtropikal bölgelerde daha yaygındır. *A. centrale* ise daha çok Afrika, Avustralya ve İsrail'de görülmektedir (Kocan ve ark., 2010).

Anaplazmozis, Amerika kıtasında oldukça yaygındır. ABD'de yıllık ekonomik kaybın 300 milyon dolardan fazla olduğu tahmin edilmektedir. Latin Amerika'da ise hastalık

ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Örneğin, Brezilya'da anaplazmosis ve babesiozis kaynaklı yıllık ekonomik kaybın yaklaşık 875 milyon dolar olduğu bildirilmiştir (Grisi ve ark., 2014).

Avrupa'da anaplazmosis daha çok Akdeniz ülkelerinde görülmektedir. İspanya, İtalya, Portekiz ve Yunanistan'da hastalık endemiktir. Kuzey Avrupa ülkelerinde ise daha nadir rastlanmaktadır, ancak iklim değişikliği hastalığın yayılım alanının genişleyebileceği öngörülmektedir (de la Fuente ve ark., 2008).

Asya'da, özellikle Hindistan, Pakistan, Çin ve Güneydoğu Asya ülkelerinde anaplazmosis yaygın olarak görülmektedir. Bu bölgelerde hastalık, sığır yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Ybañez ve ark., 2013).

Afrika kıtasında anaplazmosis endemiktir ve birçok ülkede ciddi bir sorun teşkil etmektedir. Özellikle Güney Afrika'da hastalık yaygın olup, sığır ölümlerinin önemli bir kısmından sorumludur. Ayrıca, *A. centrale*'nin aşısı suşu ilk olarak bu ülkede geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır (Potgieter ve van Rensburg, 1987).

Avustralya'da anaplazmosis, özellikle kuzey bölgelerde yaygındır. Ülkede hastalık kontrolü için *A. centrale* aşısı yaygın olarak kullanılmaktadır. Avustralya'da anaplazmosis ve babesiozis kaynaklı yıllık ekonomik kaybın yaklaşık 30,5 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir (Sackett ve ark., 2006).

2.2.3 Türkiye'deki Durum

Türkiye'de anaplazmosis endemiktir ve ülkenin hemen her bölgesinde görülmektedir. Yapılan çalışmalarda, sığırlarda *A. marginale* prevalansının bölgelere göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Örneğin, Kars ilinde yapılan bir çalışmada, sığırlarda *A. marginale* prevalansı %41 olarak bulunmuştur (Aktaş ve ark., 2011).

Doğu Anadolu Bölgesi'nde yapılan bir başka çalışmada, *A. marginale* prevalansı %20,7 olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, *A. centrale* prevalansı %1,3, *A. phagocytophilum* prevalansı ise %5,3 olarak bulunmuştur. Bu çalışma, Türkiye'de *A. phagocytophilum*'un varlığını laboratuvar ortamında doğrulayan ilk çalışma olmuştur (Aktaş ve Özübek, 2015).

Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan 1105 sığır kan örneğinin incelendiği kapsamlı bir çalışmada, *A. marginale* prevalansı %26,6 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, *A. marginale*'nin Türkiye'deki coğrafi dağılımı da ortaya konmuştur. Buna göre, en yüksek prevalans Güneydoğu Anadolu (%51,1) ve Doğu Anadolu (%39,0) bölgelerinde görülürken, en düşük prevalans Ege Bölgesi'nde (%1,5) tespit edilmiştir 1.

Türkiye'de anaplazmozis vakalarının çoğunlukla yaz ve sonbahar aylarında görüldüğü, bu durumun kene aktivitesinin arttığı dönemlerle örtüştüğü bildirilmiştir. Ülkemizde *A. marginale*'nin başlıca vektörü olarak *Rhipicephalus* türü keneler gösterilmektedir. Özellikle *R. turanicus* ve *R. bursa* türleri önemli vektörler olarak bildirilmiştir (İnci ve ark., 2019).

Türkiye'de anaplazmozis ile ilgili yapılan moleküler çalışmalar, ülkede farklı *A. marginale* genotiplerinin bulunduğunu göstermiştir. Msp1a gen bölgesi analiz edilerek yapılan bir çalışmada, Türkiye'de 16 farklı *A. marginale* genotipi tespit edilmiştir. Bu genotiplerden 12'sinin daha önce dünyada rapor edilmemiş yeni genotipler olduğu belirlenmiştir. Bu durum, Türkiye'deki *A. marginale* suşlarının genetik çeşitliliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Ayrıca, Türkiye'de *A. marginale*, *Babesia bovis* ve *Theileria annulata*'nın eş zamanlı tespiti için bir multiplex PCR yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem, bu üç önemli sığır patojeninin hızlı ve güvenilir bir şekilde teşhis edilmesine olanak sağlamaktadır (Bilgiç ve ark., 2013).

Türkiye'de anaplazmozis kontrolü için genellikle akarisitler ve tetrasiklinler kullanılmaktadır. Ancak, ülkede *A. centrale* aşısının kullanımı yaygın değildir. Bununla birlikte, hastalığın kontrolü için daha etkili stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmalar, Türkiye'de anaplazmozis'in yaygın olduğunu ve hastalığın kontrolü için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Özellikle, farklı *Anaplasma* türlerinin prevalansının belirlenmesi, vektör kenelerin dağılımının haritalanması ve yeni kontrol stratejilerinin geliştirilmesi gelecekteki araştırmaların odak noktası olmalıdır.

2.3 Sığırlarda Anaplasmosis'in Teşhis ve Tedavisi

2.3.1 Teşhis

Anaplazmozis'in teşhisinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler klinik, mikroskopik ve moleküler yöntemler olarak kategorize edilebilir.

1. Klinik Teşhis:

Anaplazmozis'in klinik belirtileri genellikle non-spesifiktir ve diğer hemolitik hastalıklarla karıştırılabilir. Tipik belirtiler arasında ateş, anemi, sarılık, iştahsızlık, kilo kaybı, süt veriminde düşüş ve abort sayılabilir (Kocan ve ark., 2010). Ancak klinik belirtiler hastalığın kesin teşhisi için yeterli değildir ve diğer teşhis yöntemleriyle desteklenmelidir.

2. Mikroskopik Teşhis:

a) Kan Frotisi: Anaplazmozis'in teşhisinde en eski ve hala yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri kan frotisinin incelenmesidir. Bu yöntemde, periferik kandan alınan ince yayma preparatları Giemsa veya benzeri boyalarla boyanarak ışık mikroskopunda incelenir. *A. marginale* enfeksiyonunda, eritrositlerin kenarında 0,3-1,0 µm çapında, koyu mor renkli, yuvarlak inklüzyon cisimcikleri görülür. *A. centrale* ise eritrositlerin merkezine daha yakın konumlanır (Aubry ve Geale, 2011).

Kan frotisi incelemesi, özellikle akut enfeksiyonlarda ve yüksek parazitemi durumlarında etkili bir yöntemdir. Ancak, kronik enfeksiyonlarda veya taşıyıcı hayvanlarda parazitemi düzeyi çok düşük olabilir (<%1) ve bu durumda mikroskopik inceleme yeterince hassas olmayabilir. Ayrıca, bu yöntem *Anaplasma* türlerinin kesin ayrımını yapmakta yetersiz kalabilir (Hove ve ark., 2018).

b) Kalın Damla Yöntemi: Bu yöntem, özellikle düşük parazitemi durumlarında kan frotisine göre daha hassastır. Ancak, parazitlerin morfolojisini değerlendirmek için uygun değildir (Aubry ve Geale, 2011).

3. Serolojik Testler:

Serolojik testler, *Anaplasma* türlerine karşı oluşan antikorların tespitinde kullanılır. Bu testler arasında komplement fiksasyon testi (CFT), kart aglütinasyon testi (CAT), indirek floresan antikor testi (IFAT) ve enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) sayılabilir. Bu testler, özellikle epidemiyolojik çalışmalarda ve sürü taramalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, türler arası çapraz reaksiyonlar nedeniyle kesin tür tanımlaması yapmak zor olabilmektedir (Hove ve ark., 2018).

4. Moleküler Teşhis Yöntemleri:

Moleküler yöntemler, *Anaplasma* türlerinin tespitinde ve ayırımında en hassas ve spesifik yöntemlerdir. Bu yöntemler arasında:

- a) Konvansiyonel PCR
- b) Nested PCR
- c) Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR)
- d) Ters çizgi blot hibridizasyon testi; bulunmaktadır.

Bu yöntemler arasında, qPCR'ın Güney Afrika'da *A. marginale* ve *A. centrale*'nin tespitinde en hassas yöntem olduğu belirlenmiştir (Hove ve ark., 2018).

Son zamanlarda geliştirilen multipleks PCR yöntemleri, *A. marginale*, *Babesia bovis* ve *Theileria annulata* gibi birden fazla patojeni aynı anda tespit etme imkânı sunmaktadır. Bu yöntem, özellikle ko-enfeksiyonların tespitinde ve ayırıcı tanıda büyük önem taşımaktadır (Bilgiç ve ark., 2013).

5. Yeni Nesil Dizileme (NGS) Teknolojileri:

Yeni nesil dizileme teknolojileri, *Anaplasma* türlerinin genetik çeşitliliğini ve evrimsel ilişkilerini anlamada önemli bir rol oynamaktadır. Bu teknolojiler, aynı zamanda yeni *Anaplasma* türlerinin veya genotiplerinin keşfedilmesine de olanak sağlamaktadır (Hove ve ark., 2018).

Sonuç olarak, anaplazmozis'in doğru teşhisi için klinik belirtilerin değerlendirilmesi, mikroskopik inceleme ve moleküler yöntemlerin birlikte kullanılması önerilmektedir. Özellikle endemik bölgelerde, rutin sürü taramaları ve epidemiyolojik çalışmalar için serolojik ve moleküler yöntemlerin kombinasyonu etkili bir yaklaşım olabilir.

2.3.2 Tedavi, Kontrol ve Profilaksi

Anaplazmozis'in tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlar tetrasiklinlerdir. Özellikle oksitetrasiklin, hem tedavi hem de profilaksi amacıyla kullanılmaktadır (Kocan ve ark., 2010). Genellikle 5-10 mg/kg dozunda intramusküler veya intravenöz olarak uygulanır. Tedavi süresi hastalığın şiddetine göre 3-5 gün arasında değişebilir.

İmidokarb dipropiyonat da anaplazmozis tedavisinde etkili bir diğer ilaçtır. 3 mg/kg dozunda intramusküler olarak uygulanır ve gerekirse 7-14 gün sonra doz tekrarlanabilir (Kocan ve ark., 2010).

Destekleyici tedavi olarak, dehidrasyon durumunda sıvı tedavisi, anemi durumunda kan transfüzyonu ve gerekirse antiinflamatuvar ilaçlar kullanılabilir. Ayrıca, sekonder bakteriyel enfeksiyonları önlemek için geniş spektrumlu antibiyotikler de tedaviye eklenebilir (Kocan ve ark., 2010).

Anaplazmozis'in kontrolünde en önemli faktör vektör mücadelesidir. Bu amaçla, akarisitler yaygın olarak kullanılmaktadır (Kocan ve ark., 2010). Ayrıca, endemik bölgelerde aşılama da önemli bir kontrol yöntemidir.

A. centrale canlı aşısı, birçok ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu aşı, *A. marginale*'ye karşı çapraz koruma sağlar. Ancak, bu aşının kan yoluyla bulaşan diğer patojenleri de taşıma riski bulunmaktadır (Aubry ve Geale, 2011).

Son yıllarda, daha güvenli ve etkili aşuların geliştirilmesi üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Özellikle *A. marginale*'nin dış membran proteinleri (OMP'ler) potansiyel aşı adayları olarak gösterilmektedir. Ancak, Güney Afrika'daki *A. marginale* suşlarının OMP'leri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır ve bu konu gelecekteki rekombinant aşı geliştirme çalışmalarında dikkate alınmalıdır (Hove ve ark., 2018).

Sonuç olarak, anaplazmozis'in etkili kontrolü için hassas ve spesifik tanı yöntemlerinin kullanılması, uygun tedavi protokollerinin uygulanması ve etkili kontrol stratejilerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Gelecekteki araştırmalar, özellikle yeni nesil aşıların geliştirilmesi ve bölgesel suşlara özgü kontrol stratejilerinin oluşturulması üzerine yoğunlaşmalıdır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışma Sahası ve Sığırlardan Kan Örneklerinin Toplanması

Bu tez çalışması, Kayseri ilinin Develi ve Yahyalı ilçelerinde yürütülmüştür. Develi, Kayseri'nin güneydoğusunda yer alan ve 1075 km²'lik yüzölçümü ile ilin en büyük ilçesidir. Deniz seviyesinden ortalama 1150 metre yükseklikte bulunan ilçe, Erciyes Dağı'nın güneyinde konumlanmıştır. İlçe, önemli bir tarım ve hayvancılık merkezidir. Yahyalı ise Kayseri'nin güneybatısında, Develi'nin batısında yer almaktadır. 795 km²'lik bir alana sahip olan ilçe, deniz seviyesinden ortalama 700 metre yüksekliktedir. Aladağlar'ın eteklerinde kurulu olan Yahyalı, coğrafi konumu nedeniyle hem tarım hem de hayvancılık için elverişli bir bölgedir.

Çalışma kapsamında, Nisan 2023 - Mayıs 2024 tarihleri arasında toplam 150 sığırdan kan örnekleri toplanmıştır. Her iki ilçeden eşit sayıda olmak üzere, Develi'den 75 ve Yahyalı'dan 75 sığırdan örnekleme yapılmıştır.

Kan örnekleri, rastgele seçilen ve en az bir kene mevsimi geçirmiş sığırlardan alınmıştır. Her bir hayvanın kuyruk ucundan steril lanset yardımı ile perifer kan örneği alınarak yayma froti hazırlanmıştır. Ayrıca, hayvanların kulak küpelerindeki numaralar kaydedilerek örnekler ile eşleştirilmiştir. DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere EDTA'lı tüplere 3'er mL kan örneği alınmıştır. Alınan kan örnekleri, +4°Cyi sağlayan termosta muhafaza edilmiş ve laboratuvara getirildikten sonra DNA ekstraksiyonunda kullanılmaya kadar -20°Cde saklanmıştır.

Örnek alınan sığırların bölge, yaş ve cinsiyete göre dağılımları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kayseri yöresinde sığırlardan toplanan örnek sayılarının bölge, yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Grup	Develi	Yahyalı	Toplam
Yaş			
<1	28	27	55
1-3	34	34	68
3>	13	14	27
Cinsiyet			
Dişi	37	36	73
Erkek	38	39	77
Toplam	75	75	150

3.2 Genomik DNA Ekstraksiyonu ve 16S rRNA Gen Bölgesi PCR Analizleri

Sığır kan örneklerinden genomik DNA (gDNA) izolasyonu için ticari bir kit (PureLink™ Genomic DNA kit, Invitrogen™) kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi aşağıdaki adımları içermektedir:

1. Dondurulmuş EDTA'lı kan örnekleri oda sıcaklığında çözündürülüp vortekslenerek homojenize edilmiştir.
2. Her örnekten 200 µL alınarak steril 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
3. Örnekler 20 µL Proteinaz K ve 20 µL RNaz A eklenerek karıştırılmış ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. 200 µL lizis tamponu eklenip vortekslenmiştir.
5. Karışım 55°C'de 4 saat inkübe edilmiş, bu süre boyunca her 20 dakikada bir vortekslenmiştir.
6. İnkübasyon sonrası 200 µL etanol (%96-100) eklenip homojenize edilmiştir.
7. Hazırlanan karışım, kit içindeki spin kolonlara aktarılmıştır.
8. Kolonlar 10,000 × g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

9. Filtrat atılıp, kolonlara önce 500 µL Yıkama Tamponu 1, ardından 500 µL Yıkama Tamponu 2 eklenmiş ve her aşamada santrifüj edilmiştir.
10. Kolonlar yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılıp, 150 µL elüsyon tamponu eklenmiştir.
11. 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra maksimum hızda santrifüj edilmiştir.
12. Elde edilen gDNA örnekleri -20°C'de saklanmıştır.

Ekstraksiyon işlemi sırasında olası kontaminasyonları kontrol etmek amacıyla her sette pozitif ve negatif kontroller de kullanılmıştır.

Son olarak, elde edilen gDNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak ölçülmüştür. Bu ölçüm, DNA ekstraksiyon işleminin başarısını doğrulamak ve sonraki moleküler analizler için gerekli DNA miktarını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Anaplasma/Ehrlichia türlerinin tespiti için, 16S rRNA geninin bir bölgesini hedefleyen nested PCR yöntemi kullanılmıştır. PCR reaksiyonları için Thermo Scientific DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Catalog number: K1081) kullanılmıştır. Bu kit, DreamTaq DNA Polimeraz, optimize edilmiş DreamTaq buffer, MgCl₂ ve dNTP'leri içeren kullanıma hazır bir çözeltidir.

PCR karışımı bileşenleri:

- 12.5 µL DreamTaq PCR Master Mix (2X)
- 1 µL Forward primer (10 µM)
- 1 µL Reverse primer (10 µM)
- 1-5 µL Kalıp DNA
- Nükleaz içermeyen su ile 25 µL'ye tamamlanır

İlk tur PCR amplifikasyonunda EC9/EC12A primer çifti kullanılarak 1462 bp uzunluğunda bir fragment elde edilmiştir. İkinci tur (nested) PCR'da ise 16S8FE/BGA1B primer çifti kullanılarak, 16S rRNA geninin hipervariable V1

bölgesinden 492-498 bp uzunluğunda bir fragment amplifiye edilmiştir (Schouls ve ark., 1999). PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. PCR analizinde kullanılan oligonükleotid primerler

Primer	Sekans (5'-3')	Referans
EC9	TACCTTGTTACGACTT	Kawahara ve ark., 2006
EC12A	TGATCCTGGCTCAGAACGAACG	Kawahara ve ark., 2006
16S8FE	GGAATTCAGAGTTGGATCMTGGYT CAG	Schouls ve ark., 1999
B-GA1B	CGGGATCCCAGATTTGCCGGGACTTCTTCT	Schouls ve ark., 1999

İkinci tur PCR için, ilk tur PCR ürününden 1 µL DNA kalıp olarak kullanılmıştır. Non-spesifik amplifikasyonu azaltmak için "touchdown" PCR programı uygulanmıştır. Bu program, erken PCR döngülerinde optimum sıcaklıktan daha yüksek bir bağlanma sıcaklığı kullanılmasını içermektedir (Aktas ve Ulucesme, 2021). Bu program şu şekilde uygulanmıştır:

1. 94°C'de 3 dakika başlangıç denatürasyonu
2. İki döngü: 94°C'de 20 saniye, 67°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye
3. İki döngü: 94°C'de 20 saniye, 65°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye
4. Sonraki her iki döngü setinde bağlanma sıcaklığı 2°C düşürülerek 57°C'ye ulaşana kadar devam edilmiştir
5. 40 döngü: 94°C'de 20 saniye, 57°C'de 30 saniye, 72°C'de 20 saniye
6. Son uzama: 72°C'de 7 dakika

PCR ürünleri, %1,5'lik agaroz jelde elektroforez yöntemiyle görüntülenmiştir. Pozitif kontrol olarak Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Münir AKTAŞ'tan temin edilen Anaplasma marginale ve Anaplasma phagocytophilum DNA'ları, negatif kontrol olarak ise steril deiyonize su kullanılmıştır.

3.3 Sekans ve Filogenetik Analizler

PCR ile pozitif sonuç veren tüm ampliconlar, GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan örnekler, Sanger sekanslama yöntemi ile çift yönlü olarak dizilenmiştir (Macrogen, Kore). Sekanslama sonucu elde edilen ham okuma verileri (yaklaşık 500 baz çifti uzunluğunda) Geneious Prime 2020.0.3 yazılımı kullanılarak işlenmiştir (Kearse ve ark., 2012). Bu işlem sırasında, ileri ve geri yönlü okumalar DeNovo assemble yöntemi ile bir araya getirilmiş ve her örnek için bir konsensus sekans elde edilmiştir. Bu aşamada, okuma kalitesi düşük olan bölgeler trimlenmiş ve hatalı bazlar düzeltilmiştir.

Elde edilen final sekansları yaklaşık 490 bp uzunluğunda olup, bu sekanslar GenBank veritabanındaki referans sekanslarla karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma işlemi için BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizi kullanılmıştır (Altschul ve ark., 1990). BLAST analizi sonuçları, tespit edilen *Anaplasma* türlerinin GenBank'taki en yakın akrabalarını ve benzerlik oranlarını göstermiştir.

Tespit edilen genotiplerin filogenetik analizleri, Geneious Prime yazılımında bulunan PHYML (PHYlogenetic inferences using Maximum Likelihood) eklentisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Guindon ve ark., 2010). Filogenetik ağaç oluşturulurken HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) genetik uzaklık modeli kullanılmıştır (Hasegawa ve ark., 1985). Bu model, jModeltest v.0.1.1 yazılımı kullanılarak Akaike Bilgi Kriteri (AIC) algoritmasına göre en uygun DNA modeli olarak belirlenmiştir (Posada, 2008; Akaike, 1974).

Filogenetik ağaç oluşturma işlemi şu adımları içermiştir:

1. Sekansların Geneious Prime'a yüklenmesi ve hizalanması
2. En uygun evrimsel model olan HKY modelinin seçilmesi
3. PHYML eklentisi ile Maximum Likelihood metodu kullanılarak ağaç oluşturulması
4. 1000 tekrarlı bootstrap analizi ile dalların güvenilirliğinin test edilmesi

Oluşturulan filogenetik ağaç, çalışmada tespit edilen Anaplasma türlerinin diğer bilinen türlerle olan evrimsel ilişkilerini göstermiştir. Bootstrap değerleri %70 ve üzeri olan dallar güvenilir kabul edilmiş ve ağaç üzerinde gösterilmiştir (Felsenstein, 1985).

3.4 İstatistik Analizler

Sığırların yaş ve cinsiyeti ile Anaplasmosis enfeksiyonu arasındaki ilişkinin istatistiksel analizi, GraphPad Prism versiyon 9.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (GraphPad Software, 2021).

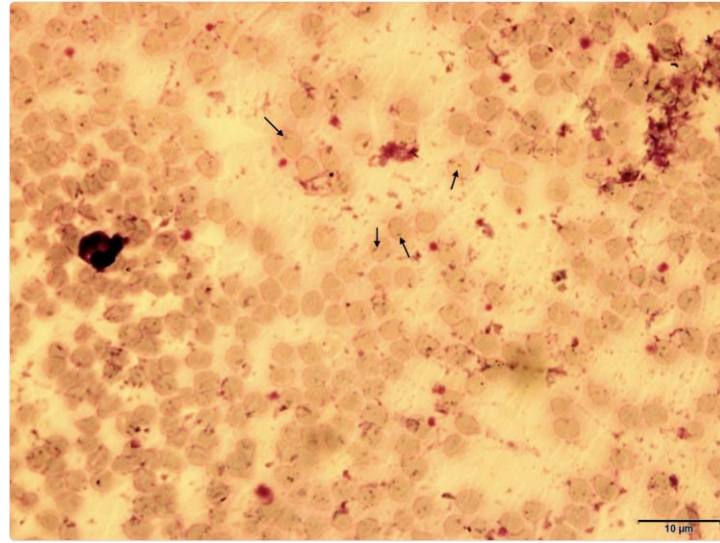
Yaş grupları (1 yaşından küçük, 1-3 yaş arası ve 3 yaşından büyük) ve cinsiyet (dişi ve erkek) ile Anaplasmosis enfeksiyonu arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için ki-kare testi uygulanmıştır (Pearson, 1900). Bu test, kategorik değerşkenler arasındaki ilişkiyi incelemek için kullanılmıştır ve $p < 0.05$ değerı istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Yaş grupları arasındaki enfeksiyon prevalansı farklılıklarını daha detaylı incelemek için, ikili karşılaştırmalar Fisher's exact test kullanılarak yapılmıştır (Fisher, 1922). Bu test, özellikle küçük örneklem boyutlarında kategorik değerşkenler arasındaki ilişkiyi analiz etmek için tercih edilmiştir.

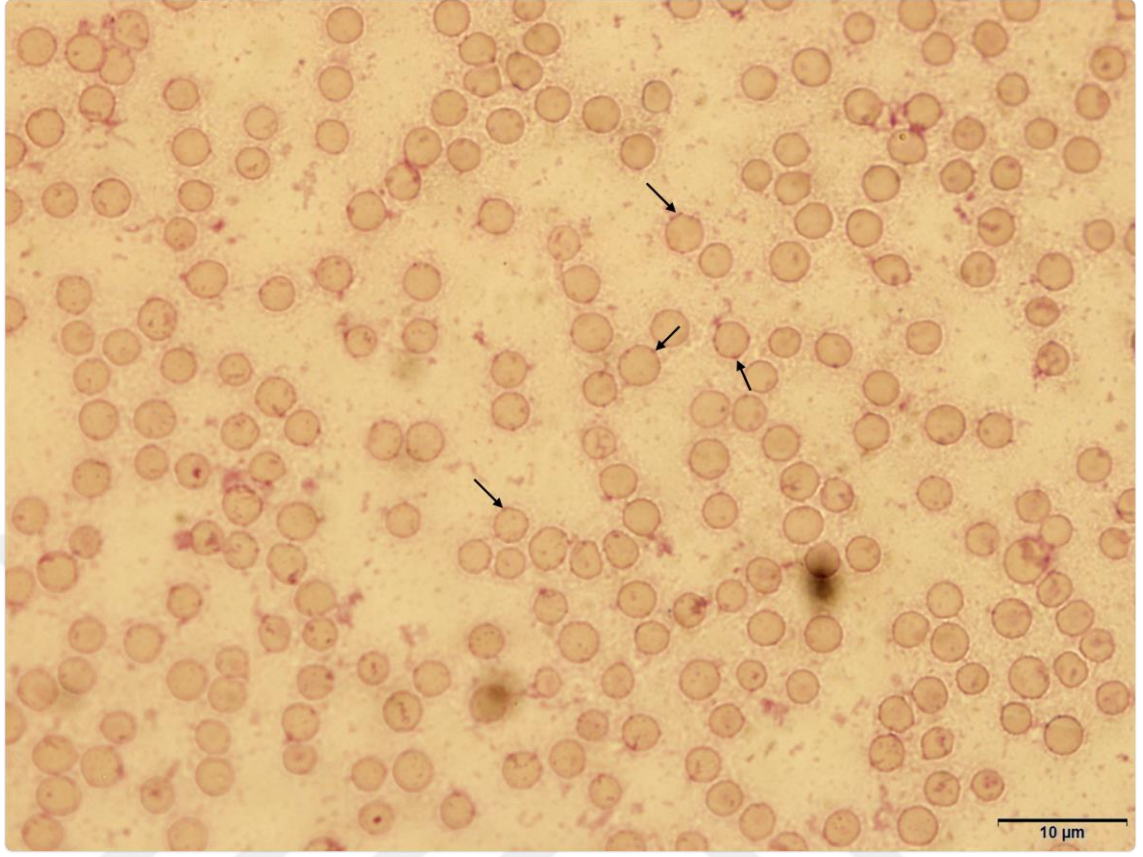
4. BULGULAR

4.1 Mikroskopik Analiz Bulguları

Çalışma kapsamında perifer kan frotilerinin incelenmesi sonucunda incelemesi yapılan 150 sığırdan dördünün (%2,66) *Anaplasma* türleri ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. *A. marginale* için Giemsa veya acridine orange boyalı kan yaymalarında eritrositlerin kenarında 0.3-1.0 µm çapında koyu mor renkli inklüzyon cisimcikleri olarak görülmesi (Kocan ve ark., 2010), *A. centrale*'nin ise eritrositlerin merkezine yakın konumlanması (Potgieter ve van Rensburg, 1987) kriterleri temelinde pozitif dört örneğin üçü *A. centrale*, biri ise *A. marginale* olarak teşhis edilmiştir. Mikroskopik analiz sonucu kan frotilerinde tespit edilen *A. marginale* ve *A. centrale* görüntüleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.



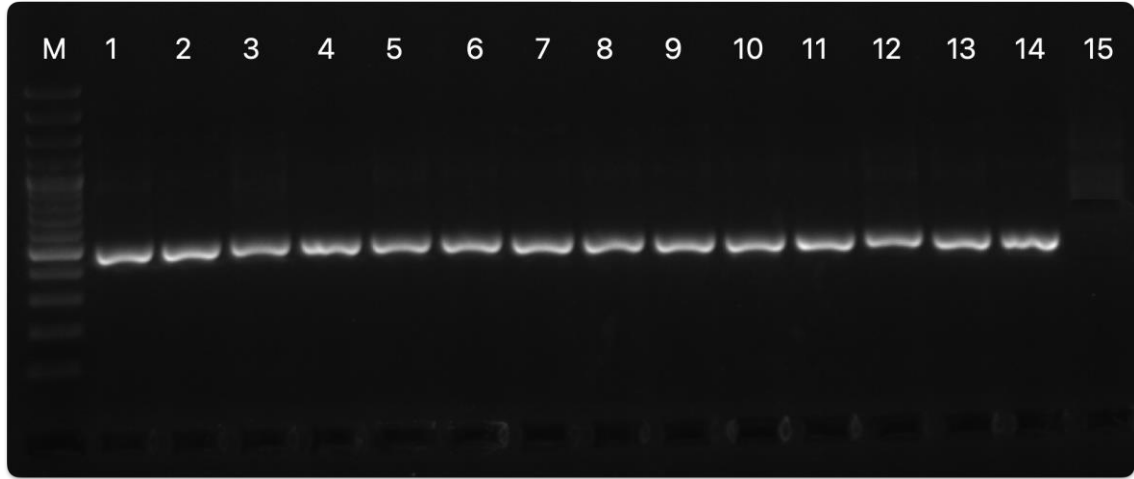
Şekil 4.1. Enfekte sığır perifer kan frotisinde *A. centrale* (Orijinal)



Şekil 4.2. Enfekte sığır perifer kan frotisinde *A. marginale* (Orijinal)

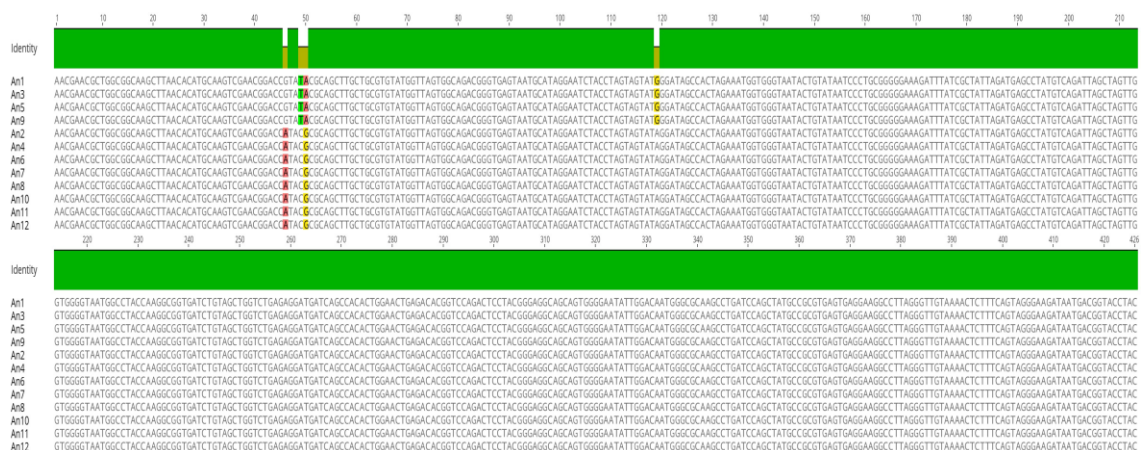
4.2 Nested PCR ve Sekans Analizi Bulguları

Sığır kan örneklerinden ekstrakte edilen gDNA izolatlarında *Anaplasma/Ehrlichia* 16S rRNA geninin hipervariable V1 bölgesini amplifiye eden spesifik primerlerle nested PCR analizi sonucunda 150 örnekten toplam 12 örneğin pozitif olduğu (%8,00) tespit edilmiştir. Pozitif belirlenen örneklere ait yaklaşık 498 bp büyüklüğündeki amplikonların agaroz jel üzerinde görünüşleri Şekil 4.3’de verilmiştir. Mikroskopik muayenede pozitif belirlenen örnekler Nested PCR ile de pozitif saptanmıştır.



Şekil 4.3. *Anaplasma/Ehrlichia* 16S rRNA geninin hipervariable V1 bölgesini amplifiye eden spesifik primerlerle nested PCR analizi sonucunda belirlenen hedef büyüklükte (~490 bp) ampliconların agaroz jel üzerinde görünümü: Marker (100 bp); 1-12 pozitif örnekler; 13-14: Pozitif kontrol DNA örnekleri; 15: No DNA kontrol

Pozitif örneklere ait tüm 16S rRNA ampliconları Sanger platformunda çift yönlü olarak sekanslanmış ve primer dizileri çıkarıldıktan sonra izolatlara ait 460 bp uzunluğunda kalite skoru yüksek ($q > 40$) konsensus dizilimler elde edilmiştir. Tüm konsensus dizilimler hizalanmış ve birbiri ile tamamen identik olan sekansların iki grupta toplandığı görülmüştür. Birinci grup sekiz, ikinci grup ise 4 izolatı içermiştir. İki grup arasında 46. bazda G/A, 49. bazda T/C, 50. bazda A/G ve 119. bazda G/A değişimleri tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Her iki gruptaki izolatların %99,1 oranında benzer oldukları ve yalnızca %0,8 genetik farklılık gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. Çalışmada karakterize edilen *Anaplasma* izolatlarının sekanslanan 16S rRNA gen bölgelerinin hizalama analizi sonrasında belirlenen nükleotid farklılıkları

Tablo 4.1. Çalışmada karakterize edilen *Anaplasma* izolatlarının sekanslanan 16S rRNA gen bölgelerinin hizalama analizine göre benzerlik matrisleri

	An1	An3	An5	An9	An2	An4	An6	An7	An8	An10	An11	An12
An1		100%	100%	100%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%
An3	100%		100%	100%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%
An5	100%	100%		100%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%
An9	100%	100%	100%		99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%
An2	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
An4	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	100%		100%	100%	100%	100%	100%	100%
An6	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	100%	100%		100%	100%	100%	100%	100%
An7	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	100%	100%	100%		100%	100%	100%	100%
An8	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	100%	100%	100%	100%		100%	100%	100%
An10	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	100%	100%	100%	100%	100%		100%	100%
An11	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		100%
An12	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	

Sekans karakterizasyonu sonrasında birbirine tamamen identik belirlenen her iki gruptaki izolatlar blast analizleri sonrası AmarKYS1 ve AcenKYS1 genotip isimleri verilerek isimlendirilmiştir. AmarKYS1 genotipinin referans *A. marginale* sekansları ile %100, AcenKYS1 genotipinin de referans *A. centrale* sekansları ile %100 benzer oldukları tespit edilmiştir. Bu sonuçlarla çalışmada pozitif belirlenen 12 izolatın 8'inin *A. centrale*, 4'ünün ise *A. marginale* olduğu ortaya çıkarılmıştır. AmarKYS1 ve AcenKYS1 genotiplerine ait sekansların BLAST analizi sonucunda referans izolatlarla olan identiklik matrisleri sırasıyla Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.2. AmarKYS1 genotipinin blast analizi sonrasında GenBank veri tabanında eşleştiği referans *A. marginale* kayıtları.

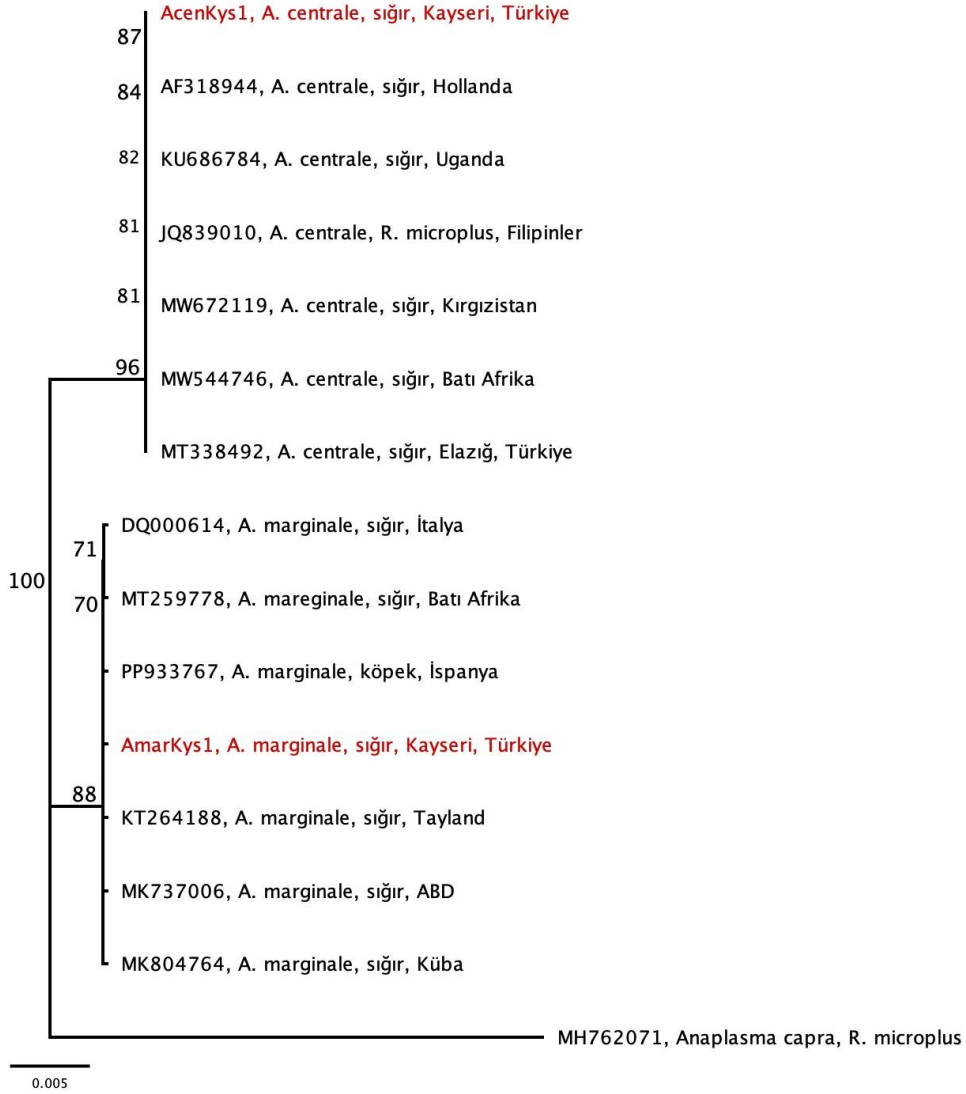
Hit Table	Query Centric View	Annotations	Distances	Info	AmarKYS1 - Nucleotide collection (nr_nt) Megablast 13									
Name	Bit-Score	E Value	Grade	Hit start	Hit end	Description ^	Sequenc...	Topolo...	Molecu...	# 5...	% Pairwise Identity	% Identical Sites	Query cover...	
KF696858	787.793	0	100.0%	11	436	Anaplasma marginale clone LDH2 16S ribos...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
MK804764	787.793	0	100.0%	12	437	Anaplasma marginale clone Oriente CuBov1...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
KT264188	787.793	0	100.0%	29	454	Anaplasma marginale isolate AmCU01 16S ri...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
JQ839012	787.793	0	100.0%	1	426	Anaplasma marginale isolate C6A 16S riboso...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
JQ839011	787.793	0	100.0%	21	446	Anaplasma marginale isolate C7D 16S ribos...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
MW255054	787.793	0	100.0%	1	426	Anaplasma marginale isolate KYNDA_70 16S...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
MT664983	787.793	0	100.0%	29	454	Anaplasma marginale isolate LO16S 16S ribo...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
PP933767	787.793	0	100.0%	1	426	Anaplasma marginale isolate RC_T11 16S rib...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
HM439433	787.793	0	100.0%	11	436	Anaplasma marginale isolate ZJ02/2009 16S...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
CP006847	787.793	0	100.0%	247,878	248,303	Anaplasma marginale str. Dawn genome	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
CP006846	787.793	0	100.0%	247,837	248,262	Anaplasma marginale str. Gypsy Plains geno...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
CP023731	787.793	0	100.0%	244,467	244,892	Anaplasma marginale strain Jaboticabal chrom...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
CP023730	787.793	0	100.0%	244,856	245,281	Anaplasma marginale strain Palmeira chrom...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	

Tablo 4.3. AcenKYS1 genotipinin blast analizi sonrasında GenBank veri tabanında eşleştiği referans *A. centrale* kayıtları.

Hit Table	Query Centric View	Annotations	Distances	Info	AcenKys1 - Nucleotide collection (nr_nt) Megablast 10									
Name	Bit-Score	E Value	Grade	Hit start	Hit end	Description	Sequenc...	Topolo...	Molecu...	# S...	% Pairwise Identity	% Identical Sites	Query cover...	
MW672120	787.793	0	100.0%	8	433	Anaplasma centrale isolate A.centrale_Kyrgy...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
MW672119	787.793	0	100.0%	17	442	Anaplasma centrale isolate A.centrale_Kyrgy...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
MW672118	787.793	0	100.0%	17	442	Anaplasma centrale isolate A.centrale_Kyrgy...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
MW672117	787.793	0	100.0%	14	439	Anaplasma centrale isolate								
JQ839010	787.793	0	100.0%	21	446	Anaplasma centrale isolate								
CP001759	787.793	0	100.0%	1,003,408	1,002,983	Anaplasma centrale str. Israel, complete gen...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
AF414869	787.793	0	100.0%	20	445	Anaplasma centrale from South Africa from ...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
AF414868	787.793	0	100.0%	20	445	Anaplasma centrale strain vaccine from Aust...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
AF318944	787.793	0	100.0%	1	426	Anaplasma centrale 16S ribosomal RNA gen...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	
AF309869	787.793	0	100.0%	21	446	Anaplasma centrale strain Israel vaccine 16S...	426	linear	DNA	2	100.0%	100.0%	100.00%	

4.3 Filogenetik Analizi Bulguları

Çalışmada karakterize edilen *A. marginale* AmarKYS1 ve *A. centrale* AcenKYS1 16S rRNA gen bölgesinin 426 bp'lik kısmının sekansları ile GenBank veri tabanında aynı türlere ait kayıtlı 16S rRNA gen bölgesi sekansları kullanılarak toplam 14 sekansı içeren filogenetik dataset oluşturulmuştur. Dış grup olarak *A. capra* 16S rRNA sekansı (MH762071) kullanılmıştır. Oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. *Anaplasma marginale* ve *A. centrale* izolatlarının 16S rRNA gen bölgesinin 426 bp'lik kısmına dayalı Maximum Likelihood filogenetik ağacı. Türkiye'den elde edilen AmarKYS1 (*A. marginale*) ve AcenKYS1 (*A. centrale*) izolatları kırmızı yazı tipi ile gösterilmiştir. Düğüm noktalarındaki sayılar 1000 tekrarlı bootstrap analizi sonucu elde edilen destek değerlerini göstermektedir. Ölçek çubuğu, nükleotid değişimi başına 0.01'lik bir mesafeyi temsil etmektedir. *Anaplasma capra* (MH762071) dış grup olarak kullanılmıştır.

Hizalama analizi ve filogenetik ağaç sonuçlarına göre; *A. marginale* ve *A. centrale* türleri, 426 bp'lik 16S rRNA gen bölgesinde belirgin farklılıklar göstermiştir. *A. centrale* sekanslarında pozisyon 22-32'de "ACCATACGCGC" dizisi bulunurken, *A. marginale* sekanslarında aynı pozisyonda "ACCGTATACGC" dizisi bulunmaktadır.

1. *A. centrale* grubu:

- AcenKys1 (Kayseri, Türkiye) izolatu, diğer *A. centrale* sekansları ile 426 bp boyunca tamamen identik görünmektedir.
- Bu yüksek benzerlik, *A. centrale*'nin farklı coğrafi bölgelerde genetik olarak oldukça korunmuş olduğunu göstermektedir.

2. *A. marginale* grubu:

- AmarKys1 (Kayseri, Türkiye) izolatu, diğer *A. marginale* sekansları ile yüksek benzerlik göstermektedir.
- *A. marginale* sekansları arasında küçük farklılıklar gözlenmiştir, ancak bu farklılıklar *A. centrale* ile olan farklılıklara kıyasla çok daha azdır.

3. Türkiye izolatları:

- AcenKys1 (Kayseri) izolatu, diğer *A. centrale* sekansları ile 426 bp boyunca tamamen identiktir.
- AmarKys1 (Kayseri) izolatu, diğer *A. marginale* sekansları ile yüksek benzerlik göstermektedir.
- MT338492 (Elazığ, Türkiye) *A. centrale* sekansı da diğer *A. centrale* sekansları ile tamamen identiktir.

4. Dış grup olarak kullanılan *A. capra* sekansı (MH762071), beklendiği gibi *A. marginale* ve *A. centrale* sekanslarından belirgin farklılıklar göstermektedir. Özellikle pozisyon 22-32'de "ACCAAATCTGT" dizisi bulunmaktadır, bu da diğer iki türden farklıdır.

4.4 Anaplasma Türlerinin Prevalansı ve İstatistiksel Analiz Bulguları

Bu çalışmada, Kayseri ilinin Develi ve Yahyalı ilçelerinden toplanan toplam 150 sığır kanı örneği *Anaplasma marginale* ve *A. centrale* varlığı açısından incelenmiştir. Elde

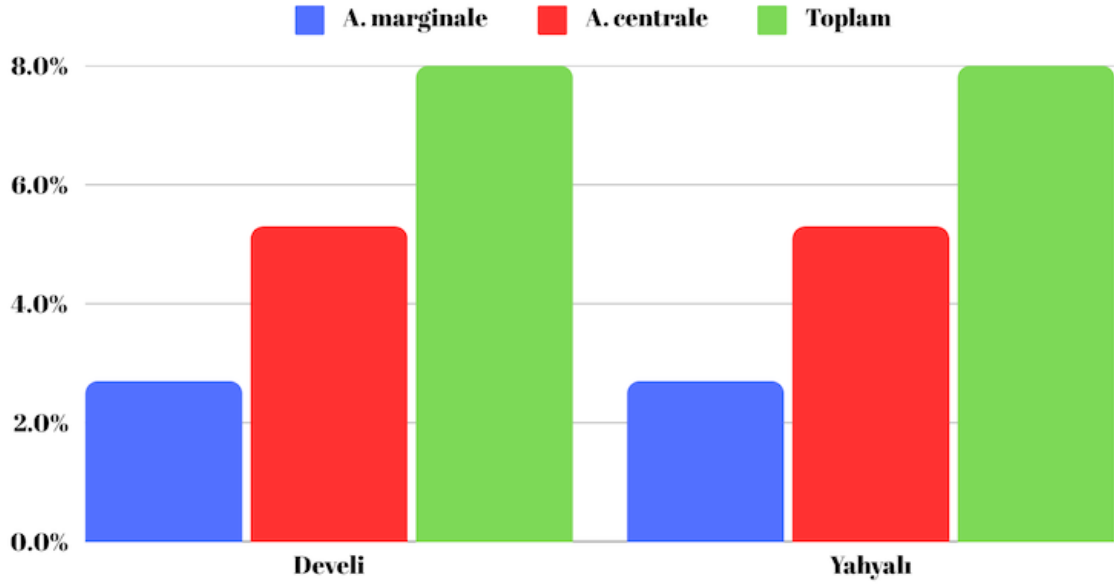
edilen sonuçlar Tablo 4.4'de detaylı olarak sunulmuştur. Verilere cinsiyet, yaş ve bölge kategorileri için Ki-Kare istatistik testi uygulanmıştır.

Genel prevalans değerlendirmesine göre, incelenen 150 sığırın 12'sinde (%8,0) *Anaplasma* türleri tespit edilmiştir. Bu enfeksiyonların 4'ü (%2,7) *A. marginale*, 8'i ise (%5,3) *A. centrale* olarak belirlenmiştir (Tablo 4.4). Bu sonuçlar, çalışma bölgesinde *A. centrale*'nin *A. marginale*'ye göre daha yaygın olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.4. Kayseri ilinin Develi ve Yahyalı ilçelerindeki sığırlarda *Anaplasma marginale* ve *A. centrale* prevalansının bölge, yaş ve cinsiyet gruplarına göre dağılımı ve istatistiksel analizi

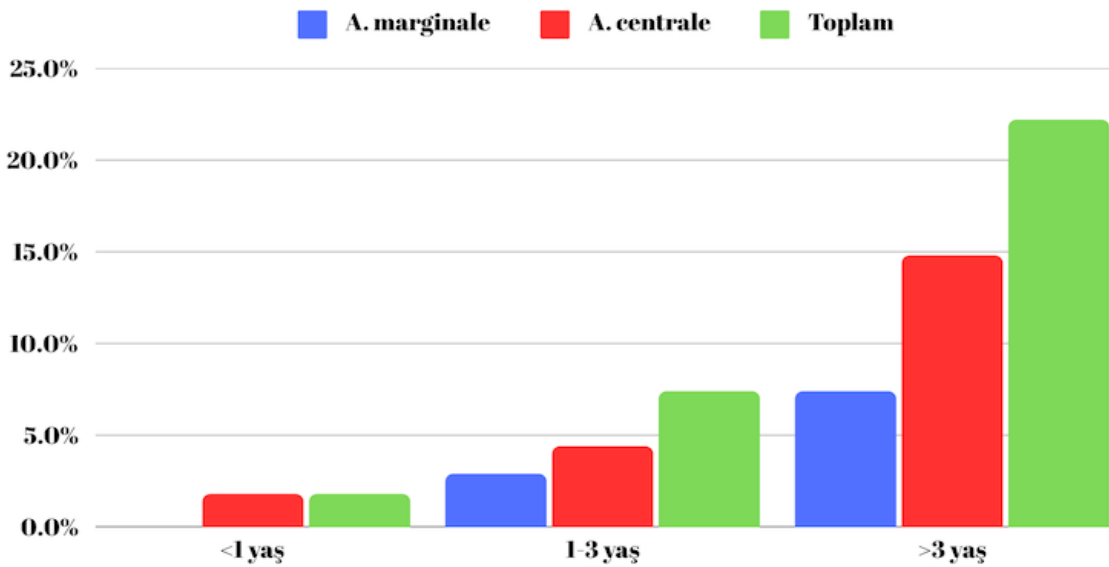
Grup	İncelenen	<i>A. marginale</i>		<i>A. centrale</i>		Toplam		Ki-kare	p değeri
		Enfekte	%	Enfekte	%	Enfekte	%		
Bölge									
Develi	75	2	2.7%	4	5.3%	6	8.0%	0	0.98
Yahyalı	75	2	2.7%	4	5.3%	6	8.0%		
Yaş									
<1	55	0	0.0%	1	1.8%	1	1.8%	11.658	3
1-3	68	2	2.9%	3	4.4%	5	7.4%		
>3	27	2	7.4%	4	14.8%	6	22.2%		
Cinsiyet									
Dişi	73	2	2.7%	4	5.5%	6	8.2%	19	0.89
Erkek	77	2	2.6%	4	5.2%	6	7.8%		
Toplam	150	4	2.7%	8	5.3%	12	8.0%	-	-

Bölgesel dağılım açısından, Develi ve Yahyalı ilçeleri arasında enfeksiyon oranları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p = 0,98$). Her iki ilçede de toplam enfeksiyon oranı %8,0 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.4, Şekil 4.6). Bu durum, çalışma alanında *Anaplasma* türlerinin homojen bir dağılım gösterdiğine işaret etmektedir.



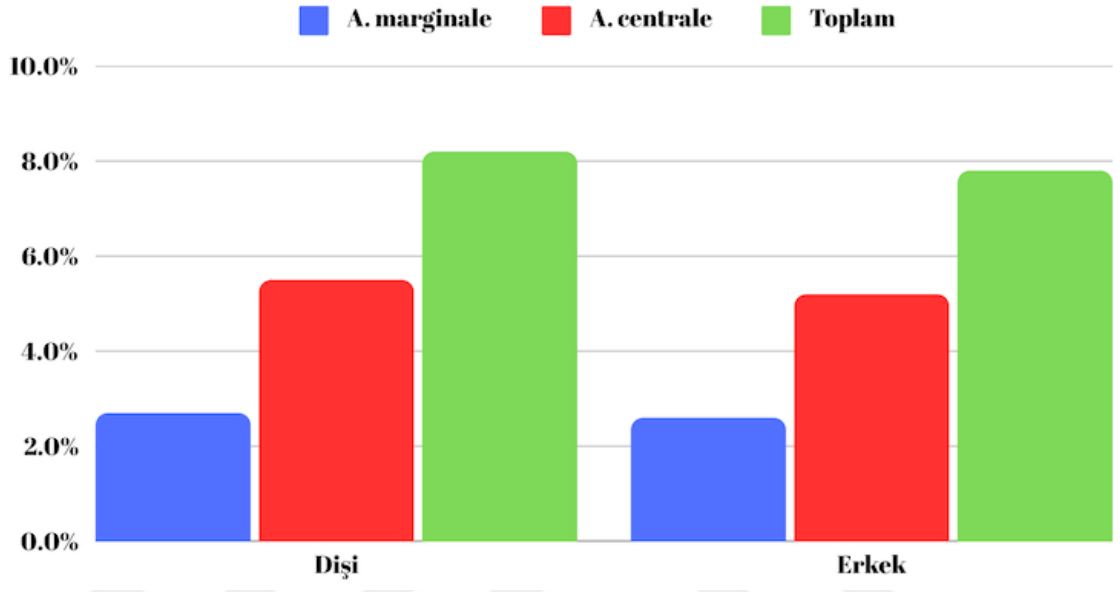
Şekil 4.6. Örneklem bölgelerine göre *Anaplasma* enfeksiyonlarının % dağılım grafiği

Yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde, enfeksiyon oranlarının yaşla birlikte arttığı gözlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0,003$). En yüksek prevalans 3 yaşından büyük hayvanlarda tespit edilmiş olup, bu grupta toplam enfeksiyon oranı %22,2'ye ulaşmıştır (Tablo 4.4, Şekil 4.7). Bu oran, 1-3 yaş grubunda %7,4, 1 yaşından küçük hayvanlarda ise %1.8 olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, yaşla birlikte *Anaplasma* enfeksiyonlarına maruz kalma riskinin önemli ölçüde arttığını göstermektedir.



Şekil 4.7. Yaş gruplarına göre *Anaplasma* enfeksiyonlarının % dağılım grafiği

Cinsiyet açısından değerlendirildiğinde, dişi ve erkek hayvanlar arasında enfeksiyon oranları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p = 0,89$). Dişi hayvanlarda toplam enfeksiyon oranı %8,2, erkek hayvanlarda ise %7,8 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.4, Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Cinsiyete göre *Anaplasma* enfeksiyonlarının % dağılım grafiği

5. TARTIŞMA

Sığırlarda anaplasmosis, dünya genelinde hayvancılık sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olan vektör kaynaklı bir hastalıktır. *Anaplasma marginale* ve *A. centrale* tarafından oluşturulan bu enfeksiyon, özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygın olarak görülmektedir (Kocan ve ark., 2010). Türkiye'de de endemik olan anaplasmosis, sığır yetiştiriciliğinde verim kaybı, tedavi maliyetleri ve ölümlere bağlı kayıplar nedeniyle önemli bir sorun teşkil etmektedir (Aktas ve ark., 2011). Bu çalışmada, Kayseri ilinin Develi ve Yahyalı ilçelerindeki sığırlarda *A. marginale* ve *A. centrale* prevalansı araştırılmış ve bölgedeki anaplasmosis durumu değerlendirilmiştir.

Anaplasmosis'in teşhisinde mikroskopik ve moleküler yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, her iki yöntem de uygulanmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Mikroskopik inceleme sonucunda, 150 sığırdan 4'ünün (%2,66) *Anaplasma* türleri ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. Bu yöntemle, *A. marginale* için eritrositlerin kenarında 0,3-1,0 µm çapında koyu mor renkli inklüzyon cisimcikleri, *A. centrale* için ise eritrositlerin merkezine yakın konumlanmış inklüzyonlar gözlemlenmiştir (Potgieter ve van Rensburg, 1987). Mikroskopik analiz, hızlı ve ekonomik bir yöntem olmakla birlikte, düşük parazitemi durumlarında yetersiz kalabilmektedir. Nitekim, bu çalışmada moleküler yöntemlerle tespit edilen prevalans (%8,00) mikroskopik yöntemle göre daha yüksek bulunmuştur.

Nested PCR ve sekans analizi, *Anaplasma* türlerinin tespiti ve karakterizasyonunda daha hassas ve spesifik sonuçlar sağlamıştır. Bu yöntemle, 150 örnekten 12'sinin pozitif olduğu (%8,00) belirlenmiştir. 3. Sekans analizi sonucunda, pozitif örneklerin 8'inin *A. centrale*, 4'ünün ise *A. marginale* olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, bölgede *A. centrale*'nin *A. marginale*'ye göre daha yaygın olduğunu göstermektedir. Moleküler yöntemlerin mikroskopik incelemeye göre daha yüksek bir prevalans tespit etmesi, bu

yöntemlerin düşük parazitemi durumlarında da etkili olduğunu ve subklinik enfeksiyonların tespitinde önemli bir avantaj sağladığını ortaya koymaktadır (Bilgic ve ark., 2013).

Çalışmada elde edilen bu bulgular, anaplasmosis'in teşhisinde moleküler yöntemlerin önemini vurgulamaktadır. Mikroskopik inceleme, sahada hızlı ön tanı için kullanışlı olmakla birlikte, kesin tanı ve tür ayrımı için moleküler yöntemlerin kullanılması daha güvenilir sonuçlar sağlamaktadır. Özellikle düşük parazitemi durumlarında ve subklinik enfeksiyonların tespitinde, PCR tabanlı yöntemler ve sekans analizi daha etkili olmaktadır (Hove ve ark., 2018). Bu nedenle, anaplasmosis'in epidemiyolojik çalışmalarında ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde moleküler yöntemlerin kullanılması önem taşımaktadır.

Çalışmamızda, Kayseri ilinin Develi ve Yahyalı ilçelerindeki sığırlarda *Anaplasma* spp. prevalansı %8,00 olarak tespit edilmiştir. Bu oran, Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında nispeten düşük kalmaktadır. Örneğin, Aktas ve Özübek (2021) tarafından yapılan çalışmada, sığırlarda *Anaplasma* spp. genel enfeksiyon oranı %38,5 olarak bulunmuştur. Bu farklılığın, örnekleme yapılan bölgelerin coğrafi ve iklimsel özelliklerinden, vektör kene popülasyonlarındaki farklılıklardan veya kullanılan tanı yöntemlerinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür. Kayseri yöresinde araştırma bölgelerinde incelenen sığırlarda *A. marginale* prevalansı %2,66 olarak tespit edilmiştir. Bu oran, Aktas ve Özübek (2021)'in çalışmasında bildirilen %32,5'lik *A. marginale* prevalansından oldukça düşüktür. Benzer şekilde, Aktas ve ark. (2021) tarafından yapılan başka bir çalışmada, *A. marginale* prevalansı %2,5 olarak bildirilmiştir ki bu oran çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara daha yakındır. Bu farklılıkların, örnekleme yapılan bölgelerin ekolojik özelliklerinden ve vektör kene türlerinin dağılımından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Diğer yandan *A. centrale* prevalansı çalışmamızda %5,33 olarak bulunmuştur. Bu oran, Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarda bildirilen oranlarla genel olarak uyumludur. Örneğin, Aktas ve Özübek (2021) *A. centrale* prevalansını %5,5 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda *A. phagocytophilum* tespit edilmemiştir. Bu bulgu, Türkiye'de yapılan bazı çalışmalarla uyumlu iken, diğerleriyle farklılık göstermektedir. Örneğin, Aktas ve Çolak (2021) sığırlarda *A.*

phagocytophilum-like suşların varlığını bildirmişlerdir. Bu farklılık, *A. phagocytophilum*'un coğrafi dağılımındaki heterojenliği veya kullanılan tanı yöntemlerinin duyarlılığındaki farklılıkları yansıtır olabilir. Köseoğlu ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, kenelerde *A. marginale* prevalansı %10,5 olarak bildirilmiştir. Bu oran, bizim sığırlarda tespit ettiğimiz orandan yüksektir. Bu durum, kene vektörlerinin *Anaplasma* türleri için önemli bir rezervuar olduğunu ve sığırlardaki enfeksiyon riskini artırabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda, enfeksiyon oranlarının yaşla birlikte arttığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,01$). En yüksek prevalans 3 yaşından büyük hayvanlarda tespit edilmiştir (%22,2). Bu bulgu, literatürdeki birçok çalışmayla uyumludur. Heylen ve ark. (2023), *A. marginale* enfeksiyonunun yaşla pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu sonuç bizim bulgularımızı desteklemektedir. Benzer şekilde, Farooqi ve ark. (2018) Pakistan'da yaptıkları çalışmada, yaşlı sığırların anaplasmosis için daha yüksek risk altında olduğunu belirtmişlerdir. Öte yandan, Awad ve ark. (2011) Sudan'da yaptıkları çalışmada, *B. bigemina* ve *A. marginale* prevalansının genç hayvanlarda daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgu, bizim sonuçlarımızla çelişmektedir. Bu farklılığın, bölgesel faktörler, vektör popülasyonları ve yönetim uygulamalarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği mütala edilmiştir. Magona ve ark. (2008), Uganda'da yaptıkları longitudinal çalışmada, *A. marginale* serokonversiyonunun yaşla ilişkili olmadığını bildirmişlerdir. Bu sonuç da bulgularımızdan farklıdır ve anaplasmosis epidemiyolojisinin karmaşıklığını göstermektedir.

Çalışmamızda, dişi ve erkek hayvanlar arasında enfeksiyon oranları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p = 0,89$). Bu bulgu, literatürdeki bazı çalışmalarla uyumlu iken, diğerleriyle çelişmektedir. Aung ve ark. (2022) Tayland'da yaptıkları çalışmada, benzer şekilde, *Anaplasma* enfeksiyonları ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulamamışlardır. da Silva ve ark. (2018) da Brezilya'da keçilerde yaptıkları çalışmada cinsiyet ile enfeksiyon arasında anlamlı bir ilişki gözlemlememişlerdir. Diğer yandan, Sahin ve ark. (2022) Türkiye'de mandalarda yaptıkları çalışmada, *A. capra* enfeksiyonunun prevalansı ile cinsiyet arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. Seerintra ve ark. (2023) Tayland'da yaptıkları çalışmada, *A. marginale* enfeksiyonunun dişi sığırlarda daha yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmaların bulguları sonuçlarımızla çelişmekle birlikte cinsiyetin önemli bir risk faktörü olabileceğini düşündürmektedir. Bu farklılıklar, anaplasmosis epidemiyolojisinin karmaşık yapısını ve bölgesel faktörlerin önemini vurgulamaktadır. Ayrıca, çalışma tasarımları, örneklem büyüklükleri ve kullanılan tanı yöntemlerindeki farklılıklar da sonuçları etkileyebilir.

Çalışmada karakterize edilen *A. marginale* AmarKYS1 ve *A. centrale* AcenKYS1 izolatlarının 16S rRNA gen bölgesinin 426 bp'lik kısmı kullanılarak filogenetik analiz yapılmıştır. Bu analiz, Türkiye'de tespit edilen *Anaplasma* türlerinin genetik yapısı ve diğer ülkelerdeki izolatlarla olan ilişkisi hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Filogenetik ağaç sonuçlarına göre, *A. marginale* ve *A. centrale* türleri, 426 bp'lik 16S rRNA gen bölgesinde belirgin farklılıklar göstermiştir. Bu farklılıklar, özellikle 22-32 pozisyonlarındaki nükleotid dizilimlerinde gözlemlenmiştir. *A. centrale* sekanslarında "ACCATACGCGC" dizisi bulunurken, *A. marginale* sekanslarında "ACCGTATACGC" dizisi tespit edilmiştir. Bu belirgin farklılık, iki türün genetik olarak ayrı evrimsel yollar izlediğini gösterebilir. *A. centrale* grubu içinde, AcenKYS1 (Kayseri, Türkiye) izolatının diğer *A. centrale* sekansları ile 426 bp boyunca tamamen identik olduğu görülmüştür. Bu yüksek benzerlik, *A. centrale*'nin farklı coğrafi bölgelerde genetik olarak oldukça korunmuş olduğunu göstermektedir. Bu durum, *A. centrale*'nin evrimsel süreçte daha stabil kaldığına işaret edebilir. *A. marginale* grubu içinde, AmarKYS1 (Kayseri, Türkiye) izolatı diğer *A. marginale* sekansları ile yüksek benzerlik göstermiştir. Ancak *A. marginale* sekansları arasında küçük farklılıklar gözlenmiştir. Bu farklılıklar, *A. centrale* ile olan farklılıklara kıyasla çok daha azdır. Bu durum, *A. marginale*'nin *A. centrale*'ye göre daha fazla genetik çeşitlilik gösterdiğini düşündürmektedir. Türkiye izolatları özelinde, AcenKYS1 (Kayseri) izolatının diğer *A. centrale* sekansları ile tamamen identik olması, Türkiye'deki *A. centrale* popülasyonunun genetik yapısının global popülasyonla büyük ölçüde benzer olduğunu göstermektedir. Ayrıca, MT338492 (Elazığ, Türkiye) *A. centrale* sekansının da diğer *A. centrale* sekansları ile tamamen identik olması, bu durumu desteklemektedir. Dış grup

olarak kullanılan *A. capra* sekansının (MH762071) *A. marginale* ve *A. centrale* sekanslarından belirgin farklılıklar göstermesi, filogenetik analizin güvenilirliğini artırmaktadır. Bu farklılık, özellikle 22-32 pozisyonlarındaki "ACCAAATCTGT" dizisi ile kendini göstermiştir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması, Kayseri ilinin Develi ve Yahyalı ilçelerindeki sığırlarda *Anaplasma* türlerinin varlığını, prevalansını ve genetik çeşitliliğini ortaya koymuştur. Toplam %8,00'lik prevalans ile *A. marginale* (%2,66) ve *A. centrale* (%5,33) tespit edilmiştir. Yaşın enfeksiyon riskini önemli ölçüde etkilediği, ancak cinsiyet ve bölgesel faktörlerin anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Filogenetik analiz, Türkiye izolatlarının global popülasyonla genetik olarak benzer olduğunu, ancak *A. marginale*'nin *A. centrale*'ye göre daha fazla genetik çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular ışığında, bölgedeki anaplasmosis kontrolü için yaşa bağlı risk faktörlerini dikkate alan stratejiler geliştirilmesi, düzenli tarama programlarının uygulanması ve vektör kontrolüne önem verilmesi önerilmektedir. Ayrıca, Türkiye'nin farklı bölgelerinde daha kapsamlı moleküler epidemiyolojik çalışmaların yapılması, ülke genelindeki *Anaplasma* türlerinin dağılımı ve genetik çeşitliliği hakkında daha detaylı bilgi sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Control*, 1974: 19(6); 716-723.
- Aktas M, Altay K, Dumanli N. Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey. *Ticks Tick Borne Dis*, 2011: 2(1); 62-65.
- Aktas M, Çolak S. Molecular detection and phylogeny of *Anaplasma* spp. in cattle reveals the presence of novel strains closely related to *A. phagocytophilum* in Turkey. *Ticks Tick Borne Dis*, 2021: 12(1); 101604.
- Aktas M, Özübek S. Bovine anaplasmosis in Turkey: First laboratory confirmed clinical cases caused by *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Microbiol*, 2015: 178(3-4); 246-251.
- Aktas M, Özübek S. Genetic diversity of major surface protein 1a of *Anaplasma marginale* in dairy cattle. *Infect Genet Evol*, 2020: 89; 104608.
- Aktas M, Özübek S. *Anaplasma ovis* genetic diversity detected by major surface protein 1a and its prevalence in small ruminants. *Vet Microbiol*, 2021: 217; 13-17.
- Aktas M, Ulucesme MC. Molecular detection of tick-borne pathogens in cattle from Cameroon. *Int J Appl Biol*, 2021: 5(2); 89-95.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990: 215(3); 403-410.
- Aubry P, Geale DW. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis*, 2011: 58(1); 1-30.

- Aung A, Kaewlamun W, Narapakdeesakul D, Poofery J, Kaewthamasorn M. Molecular detection and characterization of tick-borne parasites in goats and ticks from Thailand. *Ticks Tick Borne Dis*, 2022: 13(3); 101938.
- Awad H, Antunes S, Galindo RC, do Rosário VE, de la Fuente J, Domingos A, El Hussein AM. Prevalence and genetic diversity of *Babesia* and *Anaplasma* species in cattle in Sudan. *Vet Parasitol*, 2011: 181(2-4); 146-152.
- Bilgic HB, Karagenç T, Simuunza M, Shiels B, Tait A, Eren H, Weir W. Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Exp Parasitol*, 2013: 133(2); 222-229.
- Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles DP. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005: 102(3); 844-849.
- da Silva NB, Taus NS, Johnson WC, Mira A, Schnittger L, Valente JDM, Vieira RFC. First report of *Anaplasma marginale* infection in goats, Brazil. *PLoS One*, 2018: 13(8); e0202140.
- de la Fuente J, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci*, 2008: 13(13); 6938-6946.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001: 51(6); 2145-2165.
- Estrada-Peña A, Ayllón N, De La Fuente J. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Front Physiol*, 2012: 3; 64.

- Farooqi SH, Ijaz M, Rashid MI, Nabi H, Islam S, Aqib AI, Zhang H. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Trop Anim Health Prod*, 2018; 50(7); 1591-1598.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985; 39(4); 783-791.
- Fisher RA. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *J R Stat Soc*, 1922; 85(1); 87-94.
- GraphPad Software. GraphPad Prism version 9.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA. www.graphpad.com, 2021.
- Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, Villela HS. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 2014; 23(2); 150-156.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*, 2010; 59(3); 307-321.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano TA. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol*, 1985; 22(2); 160-174.
- Herndon DR, Palmer GH, Shkap V, Knowles Jr DP, Brayton KA. Complete genome sequence of *Anaplasma marginale* subsp. *centrale*. *J Bacteriol*, 2010; 192(1); 379-380.
- Heylen DJA, Kumsa B, Kimbita E, Frank MN, Muhanguzi D, Jongejan F, Madder M. Tick-borne pathogens and body condition of cattle in smallholder rural livestock production systems in East and West Africa. *Parasit Vectors*, 2023; 16(1); 117.
- Hove P, Khumalo ZT, Chaisi ME, Oosthuizen MC, Brayton KA, Collins NE. Detection and characterisation of *Anaplasma marginale* and *A. centrale* in South Africa. *Vet Sci*, 2018; 5(1); 26.
- İnci A, Yıldırım A, Düzlü Ö, Doğan Z, Aksoy E, Şerif B. Molecular characterization and epidemiology of *Anaplasma* infections in cattle in Turkey. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, 2019; 18; 100322.

- Ji S, Ceylan O, Ma Z, Galon EM, Zafar I, Li H, Xuan X. Protozoan and Rickettsial Pathogens in Ticks Collected from Infested Cattle from Turkey. *Pathogens*, 2022: 11(5); 500.
- Kawahara M, Rikihisa Y, Lin Q, Isogai E, Tahara K, Itagaki A, Hiramitsu Y, Tajima T. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Appl Environ Microbiol*, 2006: 72(2); 1102-1109.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Drummond A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 2012: 28(12); 1647-1649.
- Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol*, 2010: 167(2-4); 95-107.
- Köseoğlu AE, Can H, Güvendi M, Erkunt Alak S, Kandemir Ç, Taşkın T, Ün C. Molecular investigation of bacterial and protozoal pathogens in ticks collected from different hosts in Turkey. *Parasit Vectors*, 2021: 14(1); 270.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*, 2018: 35(6); 1547-1549.
- Magona JW, Walubengo J, Olaho-Mukani W, Jonsson NN, Welburn SC, Eisler MC. Clinical features associated with seroconversion to *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *Theileria parva* infections in African cattle under natural tick challenge. *Vet Parasitol*, 2008: 155(3-4); 273-280.
- Pearson K. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Philos Mag*, 1900: 50(302); 157-175.
- Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*, 2008: 25(7); 1253-1256.

- Potgieter FT, van Rensburg L. The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies and incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. Onderstepoort J Vet Res, 1987: 54(4); 557-560.
- Sackett D, Holmes P, Abbott K, Jephcott S, Barber M. Assessing the economic cost of endemic disease on the profitability of Australian beef cattle and sheep producers. Meat & Livestock Australia Limited, 2006.
- Sahin OF, Erol U, Altay K. Buffaloes as new hosts for *Anaplasma capra*: Molecular prevalence and phylogeny based on *gtlA*, *groEL*, and 16S rRNA genes. Res Vet Sci, 2022: 152; 458-464.
- Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SG, Schot CS. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. J Clin Microbiol, 1999: 37(7); 2215-2222.
- Seeritra T, Saraphol B, Thanchomnang T, Piratae S. Molecular prevalence of *Anaplasma* spp. in cattle and assessment of associated risk factors in Northeast Thailand. Vet World, 2023: 16(8); 1702-1707.
- Ybañez AP, Sivakumar T, Ybañez RHD, Vincoy MRB, Tingson JA, Perez ZO, Inokuma H. Molecular survey of bovine vector-borne pathogens in Cebu, Philippines. Vet Parasitol, 2013: 196(1-2); 13-20.
- Zivkovic Z, Nijhof AM, de la Fuente J, Kocan KM, Jongejan F. Experimental transmission of *Anaplasma marginale* by male *Dermacentor reticulatus*. BMC Vet Res, 2007: 3(1); 1-6.

KAYSERİ'NİN DEVELİ VE YAHYALI YÖRELERİNDEKİ SİĞİRLARDA ANAPLASMA TÜRLERİN MOLEKÜLER PREVALANSI VE KARAKTERİZASYONU

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 6	% 5	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	kadininstatusu.aile.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	Güz, Nurper. "Ephestia kuehniella'da transferin geninin moleküler karakterizasyonu ve savunma reaksiyonlarındaki rolü üzerinde araştırmalar", Ankara Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<% 1
5	sciencescholar.us İnternet Kaynağı	<% 1
6	fr.scribd.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Mustafa Hulusi ÖZKAN

Uyruğu: T.C.

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet
Lise	Develi Anadolu Lisesi	1999-2002
Lisans	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2004-2009
Yüksek Lisans Enstitüsü Veterinerlik Parazitolojisi	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler	2016-2025

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2013-2025	Develi İlçe Tarım Ve Orman Müdürlüğü	Veteriner hekim

YABANCI DİL

İngilizce, Orta