

Aydın Yöresinde Sığırlarda ve Kenelerde *Anaplasma / Ehrlichia* Türlerinin Belirlenmesi

Detection of *Anaplasma / Ehrlichia* Species of Cattle and Ticks in Aydın Region

Murat Hoşgör², Hüseyin Bilgin Bilgiç¹, Serkan Bakırcı¹, Ahmet Hakan Ünlü³, Tülin Karagenç¹, Hasan Eren¹

¹Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

²Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Karpuzlu İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Aydın, Türkiye

³Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Gevaş Yüksek Okulu, Van, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, sığır ve kenelerde *Anaplasma/Ehrlichia* türlerinin belirlenmesi ve bu türlerin örnekleme dönemlerindeki yaygınlığı hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Aydın'a bağlı Osmanbükü, Akçaova, Dalama ve Söke'den sığırlardan toplam 679 kan ve 186 kene örneği toplanmıştır. Toplanan örneklerde *Anaplasma/Ehrlichia* türlerini soy düzeyinde tespit eden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapılmış, ayrıca *A. marginale* ile *A. centrale* türleri, tür spesifik PZR ve *A. bovis* ile *A. phagocytophilum* türleri ise nested PZR ile belirlenmiştir.

Bulgular: Söke'de sadece Eylül, Dalama ve Akçaova'da ise Mart, Haziran, Eylül ve Aralık'ta *A. centrale* tespit edilmiştir. *A. marginale* Osmanbükü'nde sadece Haziran'da, Söke'de Aralık ve Mart, Akçaova'da Haziran, Eylül ve Mart, Dalama'da ise tüm örnekleme dönemlerinde belirlenmiştir. *A. phagocytophilum* ise tüm bölgelerde örnekleme yapılan bütün dönemlerde tespit edilmiştir. İncelenen örneklerde *A. bovis*'e rastlanmamıştır. Toplam 50 kan örneğinde miks enfeksiyona rastlanmıştır. Kene havuzlarında *A. marginale* ve *A. phagocytophilum* tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada, *A. phagocytophilum* türünün *A. marginale* ve *A. centrale*'ye oranla daha yüksek olarak bulunduğu belirlenmiştir. *A. phagocytophilum* ile *A. centrale* en yoğun olarak Akçaova'da tespit edilirken, *A. marginale* Dalama'da en yoğun olarak tespit edilmiştir. Etkenler en yoğun Eylül ve Mart'ta tespit edilmiştir. Analizler kenelerin farklı *Anaplasma/Ehrlichia* türleri ile enfekte olduğunu göstermiştir. (Türkiye Parazitol Derg 2015; 39: 291-8)

Anahtar Kelimeler: *Anaplasma/Ehrlichia* spp., kene, sığır, Aydın

Geliş Tarihi: 16.09.2015

Kabul Tarihi: 01.12.2015

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to detect the *Anaplasma/Ehrlichia* species of cattle and ticks and to provide knowledge on the prevalence of these species during sampling periods.

Methods: A total of 679 blood and 186 tick samples were collected from the Osmanbükü, Akçaova, Dalama, and Söke districts of Aydın. The samples were screened with genus polymerase chain reaction (PCR) for *Anaplasma/Ehrlichia* spp., species-specific polymerase chain reaction for *Anaplasma marginale* and *A. centrale*, and nested PCR for *A. bovis* and *A. phagocytophilum*.

Results: *A. centrale* was detected in Söke during September and in Dalama and Akçaova during March, June, September, and December. *A. marginale* was detected in Osmanbükü during June; in Söke during March and December; in Akçaova during June, September, and March; and in Dalama during the entire sampling period. *A. phagocytophilum* was detected in all regions during the entire sampling period. None of the samples were positive for *A. bovis*. Mixed infections were detected in 50 blood samples. *A. marginale* and *A. phagocytophilum* were detected in the tick samples.

Conclusion: In this study, *A. phagocytophilum* was abundantly detected compared with *A. marginale* and *A. centrale*. *A. phagocytophilum* and *A. centrale* were extensively found in Akçaova and *A. marginale* was mostly seen in Dalama. Parasites were extensively detected in September and March. The analysis indicated that collected ticks were infected with different *Anaplasma/Ehrlichia* species. (Türkiye Parazitol Derg 2015; 39: 291-8)

Keywords: *Anaplasma/Ehrlichia* spp., tick, cattle, Aydın

Received: 16.09.2015

Accepted: 01.12.2015

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Hüseyin Bilgin Bilgiç. E.posta: hbilgic@adu.edu.tr

DOI: 10.5152/tpd.2015.4525

©Telif hakkı 2015 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.tparazitolderg.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2015 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.tparazitolderg.org

GİRİŞ

Anaplasma ve *Ehrlichia* türleri lökosit, eritrosit, monosit ve nötrofillere yerleşen ya da kan damarlarındaki endotel hücrelerinin sitoplazmalarında lokalize olan obligat hücre içi etkenlerdir (1, 2). Hem vektör olan ixodid ve argasid kenelerde (*Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Rhiphicephalus*, *Ornithodoros*) hem de son konakları olan omurgalılarda çoğalırlar. Etkenler transstadial ve intrastadial yolla biyolojik olarak kenelerle aktarılırken (3), mekanik olarak da kan emen sinekler ve kontamine malzemelerle taşınabilmektedir. Hastalığa özellikle tropik ve subtropik iklim bölgelerinde enzootik ve sporadik olarak rastlanmaktadır (4). Keneler yoluyla bulaşan hastalıklar sebebiyle yetiştiriciye direk yansıyan kayıplar arasında vücut ağırlığında azalma, yavru atma, süt veriminde azalma ve ölüm gibi verim kayıpları ile veteriner tanı/tedavi giderleri ve kene mücadelesi yer almaktadır (5, 6, 7). *Anaplasma* / *Ehrlichia* türleri konak-patojen-vektörün beraber görüldüğü bölgelerde evcil hayvan yetiştiriciliği, sağlığı ve verimi açısından önemli sorunlara yol açabilmektedir (8). Eritrositlere yerleşen *Anaplasma marginale* ve *A. centrale*, ve lökositlere yerleşen *A. bovis* (= *Ehrlichia bovis*) ve *A. phagocytophilum* sığırlarda görülen *Ehrlichia* ve *Anaplasma* türleri arasındadır. Bunlardan *A. marginale*, *A. bovis* ve *A. phagocytophilum* patojen olan türler olup hayvanlarda klinik olarak ateş, hemolitik anemi, ağırlık kaybı, gebe hayvanlarda yavru atma ve bazı durumlarda ölümle seyretmektedir (9, 10). Bu türlerden *A. phagocytophilum* tarafından oluşturulan TBF (tick-borne fever) sadece evcil ve yabani ruminantlarda görülen patojen bir tür değil aynı zamanda da halk sağlığı açısından da önemlidir ve varyantları insanlarda granülositik anaplasmosis'e (HGA) neden olmaktadır (2, 11). *A. centrale* ise diğer türlere nazaran daha az patojendir. *A. centrale*'nin neden olduğu enfeksiyonlardan sonra iyileşen hayvanlarda direnç gelişmesi ve patojenitesinin daha düşük olmasından dolayı *A. marginale* enfeksiyonlarına karşı *A. centrale* canlı aşıları Afrika'da, Avustralya'da, Latin Amerika'da ve İsrail gibi ülkelerde kullanılmaktadır (12). *Anaplasma* ve *Ehrlichia* türlerinin mikroskopik muayenede teşhisi paraziteminin düşük olduğu durumlarda zordur (13). Bu türler genelde omurgalı konaklarında persiste enfeksiyonlara yol açarak bu canlıları hastalığın rezervuarları haline getirirler (14). *Anaplasma* ve *Ehrlichia* türlerinin teşhisinde alternatif bir yöntem olarak kullanılan serolojik testler, *Anaplasma* türleri arasındaki antijenik benzerliklerden dolayı, aynı hayvanda bulunabilen eş zamanlı enfeksiyonlarda tür ayırımına imkan vermemektedir (2). Moleküler yöntemler ise yüksek sensivite ve spesifitelerinden dolayı *Anaplasma* türlerinin tespitinde kullanılan en duyarlı tanı yöntemleridir (15, 16, 17, 18, 19). Subtropikal iklim kuşağında yer alan ülkemizde Marmara, İç Anadolu ve Karadeniz Bölgelerinde *A. marginale* ve *A. centrale*'nin varlığı bilinmektedir (20, 21, 22). Türkiye'de *A. phagocytophilum* türü hem saha şartlarında sığırlardan toplanan kan örnekleri ile insanlar ve barınaklardan toplanan ixodid kenelerde yapılan moleküler incelemelerde (20, 23, 24, 25, 26) hem de klinik olarak hastalık tablosu gösteren sığırlarda da mikroskopik ve moleküler olarak da tespit edilmiştir (27). Karadeniz Bölgesinde klinik olarak hastalık tablosu gösteren sığırlarda yapılan incelemelerde toplanan örneklerin %80'inde *A. phagocytophilum*'un, *A. marginale*, *A. centrale*, *Ehrlichia* sp. Omatjenne türleri ile birlikte çoklu enfeksiyon oluşturduğu belirlenmiştir (27). Ülkemiz'de

A. bovis'in varlığı moleküler olarak ortaya konulmuş, ancak yaygınlığı ile ilgili yeterli çalışma yapılmamıştır (27). Ege bölgesine bağlı Aydın yöresinde RLB hibridizasyon tekniği ile *A. centrale*, *A. marginale* ve *Ehrlichia* sp. Omatjenne türlerinin varlığı yapılan saha taramalarında tespit edilmiş, ancak bu iki tür ile sığırlarda enfeksiyon oluşturan diğer türler olan *A. bovis* ve *A. phagocytophilum*'un yaygınlığı hakkında bilgi verilmemiştir (28). Bu çalışmada Aydın yöresinde sığır ve kenelerde *Anaplasma* ve *Ehrlichia* türlerinin moleküler yöntemler kullanılarak tespiti ve bu türlerin örnekleme dönemlerindeki yaygınlığı hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali ve DNA'nın Ayrılması

Bu çalışmada sığır ve kenelerde *Anaplasma* / *Ehrlichia* türlerinin karakterizasyonu amacıyla Haziran, Eylül, Aralık 2006 ile Mart 2007 tarihlerinde Aydın iline bağlı Osmanbükü, Akçaova, Dalama ve Söke ilçelerindeki sığırlardan 679 kan ve 186 kene örneği toplanmıştır. Odaklara belirtilen dönemlerde üç ayda bir gidilmiş ve ilgili bölgelere her gidişte mümkün olduğunca aynı hayvanlardan kan örnekleri alınmaya çalışılmıştır. Toplanan kan örneklerinden Promega Wizard Genomic DNA ekstraksiyon kiti (Promega Corporation, Madison, WI, USA) kullanılarak üreticilerin tarif ettiği şekilde DNA'lar izole edilmiş ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır. Diğer taraftan sığırlar üzerinden toplanan kenelerin soy ve tür ayrımları yapılarak tür ve cinsiyetlerine göre ayrı ayrı gruplandırılıp bu kenelerden 20 adet havuz oluşturulmuştur. Oluşturulan havuzlardaki keneler sıvı azot yardımıyla mekanik olarak parçalanmış ve elde edilen ezintilerden fenol-kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Ekstrakte edilen kene DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Anaplasma / *Ehrlichia* Türlerinin PZR ile Tespiti

Toplanan kan ve kene örneklerinden DNA ekstraksiyonları yapıldıktan sonra *Anaplasma* / *Ehrlichia* türleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tespit edilmiştir. İlk olarak *Anaplasma* / *Ehrlichia* türlerinin örnek toplanan bölgelerdeki genel dağılımını belirlemek amacıyla 16S rRNA geninin tüm türlerde korunmuş ortak 345 bp'lık bölgesi çoğaltılmıştır. Bu çalışmada ayrıca, *A. marginale* ve *A. centrale* türleri major yüzey proteinini (*msp*) kodlayan genin ilgili bölgelerini çoğaltan türe özgü primerler kullanılarak tekli PZR ile çoğaltılmıştır. *A. bovis* ve *A. phagocytophilum* türlerinin tespitinde ise 16S rRNA gen bölgesi nested PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Burada ilk aşamada tüm *Anaplasma* / *Ehrlichia* türlerinde ortak korunmuş bölgeleri çoğaltılan ileri (EC9) ve geri (EC12A) yönlü primerler (Tablo 1) kullanılarak elde edilen PZR ürünleri bir sonraki aşama olan nested PZR'de kullanılmak üzere 4°C'de tutulmuştur. Daha sonra bu PZR ürünlerinden ikinci basamak olan nested PZR için 1 µl alınıp her türe ait özgül primer çiftleri kullanılarak *A. bovis* ve *A. phagocytophilum* türlerine özgü 16S gen bölgesi çoğaltılmıştır. *Anaplasma*/*Ehrlichia* türlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan soy ve *A. marginale* ve *A. centrale* türlerine özgü tekli ve *A. bovis* ile *A. phagocytophilum* türlerinin tespitinde kullanılan nested PZR'ler ve kullanılan primer çiftleri Tablo 1'de verilmiştir. Elde edilen PZR ürünlerinden 10 µl olmak koşuluyla mililitresinde 10 µl ethidiyum bromid olan %2'lik agaroz jelde 100 voltluk akımda bir saat elektroforeze tabi tutulmuş ve son olarak ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

Tablo 1. *Ehrlichia/Anaplasma* türlerinin ilgili gen bölgelerini PZR ile çoğaltmada kullanılan primer çiftlerinin özellikleri

| Türler | Primer Adı ve Dizilimi (5'-3' yönünde) | PZR | | | | | | | Kaynak |
|------------------------------|--|------------------|----------------|--------------------------|--------------------|---------------|---------------------------------------|---------------|--------|
| | | Ürün boyutu (bp) | Son hacim (µl) | dNTP (µM)/ Primer (pmol) | Taq (U)/ Hedef DNA | Öncül denat. | Siklus x [Denat.-Pr. Ann.- Ext.] | Final ext. | |
| <i>Ehrlichia /Anaplasma</i> | EHR16SF; GGTACCYACAGAAGAAGTCC | 345 | 25 | 100 / 12.5 | 0.75 / 2 | 95°C 5 dk | 10x[95°C 20sn-67°C 30 sn-72°C 30 sn] | 72°C 5 dk | 16 |
| Genus | EHR16SR; TAGCACTCATCGTTTACAGC | | | | | | 40x[95°C 20 sn-57°C 30 sn-72°C 30 sn] | | |
| <i>A. marginale</i> | MAR1bF; GCTCTAGCAGTTATGCGTC MAR1bR; CTGCTTGGGAGAATGCACCT | 265 | 25 | 200 / 10 | 1 / 2 | 95 °C 4 dk | 30x[95°C 50 sn-55°C 50 sn-65°C 50 sn] | 65°C 10 dk | 18 |
| <i>A. centrale</i> | mpb58F; CATAACTTTGTTGTAAAGCCT mpb58R; TTCCAGACCTTCCCTAACTA | 904 | 50 | 200 / 10 | 1 / 2 | 95 °C 4 dk | 35x[95°C 50 sn-56°C 50 sn-65°C 1dk] | 72°C 10 dk | 17 |
| <i>Ehrlichia/ Anaplasma*</i> | EC9; TACCTTGTACGACTT EC12A; TGATCCTGGCTCAGAACGAACG | 1,462* | 50 | 100 / 10 | 1 / 2 | 95 °C 4 dk | 40 x[95°C 30 sn-52°C 30 sn-72°C 1dk] | 72°C 10dk | 33 |
| <i>A. bovis*</i> | AB1f; CTCGTAGCTTGCTATGAGAAC AB1r; TCTCCGGACTCCAGTCTG | 551* | 25 | 100 / 10 | 1 / 2 | 95 °C 4 dk | 40x[94°C 50 sn-57°C 1 dk-72°C 1dk] | 72°C 5 dk | 33 |
| <i>A. phago.*</i> | SSAP2f; GCTGAATGTGGGGATAATTTAT SSAP2r; ATGGCTGCTTCTTTCGGTTA | 641* | 25 | 100 / 10 | 1 / 2 | 95 °C 4 dk | 40 x [94°C 50 sn-57°C 1 dk-72°C 1dk] | 72°C 5 dk | 33 |

(*); nested PZR. bp; baz çifti, µl; mikro litre, pmol; piko mol, dNTP; deoksünükleotid trifosfat, Taq; *Thermus aquaticus*, U; ünite, Denat.; denatürasyon, Pr. Ann.; primer bağlaması, Ext.; ekstensiyon

Çoğaltılan PZR Ürünlerinin Dizilim Analizleri İçin Klonlanması

Tekli ve nested PZR ile çoğaltılan hedef DNA bölgesinin doğrulanması amacıyla çoğaltılan ürünler % 2'lik agaroz jelde yukarıda belirtildiği şekilde elektroforeze tabi tutularak, ultraviyole ışık altında görüntülenmiş ve ilgili bantlar jelden kesilerek QIAGEN GEL purifikasyon kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılarak purifiye edilmişlerdir. Daha sonra purifiye edilen her gen bölgesi TOPO TA Klonlama Kiti (Invitrogen™) kullanılarak PCR-4 TOPO vektörü içerisine klonlanmış ve pozitif koloniler seçilerek dizilim analizlerinin yapılması için ticari bir şirkete gönderilmiştir (İntek; İstanbul, Türkiye).

BULGULAR

Toplanan kan ve kene örneklerinde PZR ile belirlenen *Anaplasma/ Ehrlichia* Türleri

Soy düzeyinde yapılan PZR ile *A. marginale*, *A. centrale* ve *A. phagocytophilum* türlerinin belirlenmesi için yapılan tür spesifik tekli ve nested PZR sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Yapılan PZR'lere ait agaroz jel görüntüleri Resim 1'de verilmiştir. Türleri özgü primerler kullanılarak yapılan PZR sonuçlarına göre örneklerde, *A. bovis* tespit edilemezken, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum* türleri bölgelere göre değişmekle birlikte farklı yaygınlıklarda belirlenmiştir. *A. phagocytophilum* en yoğun olarak Akçaova, Söke ve Dalama'da, *A. marginale* ise Dalama'da

tespit edilirken, etkenler en yoğun olarak örnekleme yapıldığı Mart ve Eylül aylarında görülmüştür. *A. centrale* ise Akçaova ve Dalama'da en yoğun olarak örnekleme yapıldığı Eylül ayında görülmüştür.

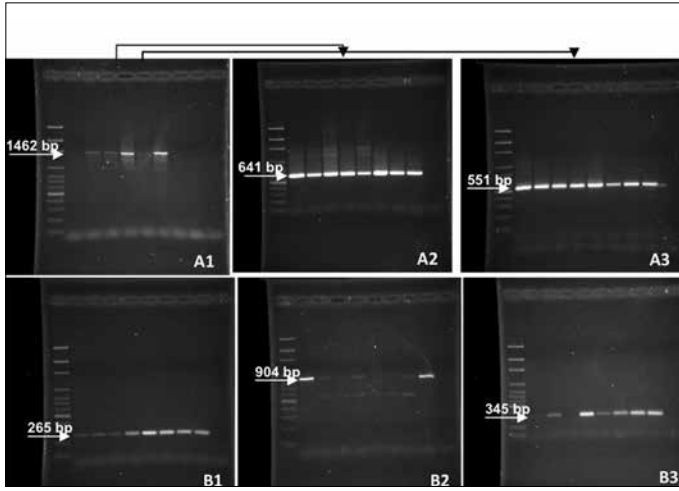
Farklı dönemlere ait toplam 50 kan örneğinde birden fazla türle mikis enfeksiyonlara rastlanmıştır (Tablo 2). Söke'de sadece iki hayvanda Eylül ayında *A. centrale* / *A. phagocytophilum* türleri ile ikili enfeksiyon tespit edilmiştir. Bununla birlikte, Akçaova'dan toplanan örneklerin 8 tanesinde (Eylül; 4 hayvan, Aralık; 3 hayvan ve Mart; 1 hayvan) *A. centrale* / *A. phagocytophilum*, Haziran, Eylül ve Mart aylarında toplanan toplam üç örnekte ise *A. marginale* / *A. phagocytophilum* ile ikili enfeksiyon tespit edilmiştir. Dalama'dan Eylül ayında toplanan bir ve Mart ayında toplanan iki örnekte *A. marginale* / *A. centrale*, Haziran ayında toplanan üç, Eylül ayında toplanan 11, Aralık ayında toplanan yedi ve Mart ayında toplanan dokuz örnekte *A. marginale* / *A. phagocytophilum*, ve Eylül ayında toplanan üç ve Mart ayında toplanan iki örnekte *A. centrale* / *A. phagocytophilum* türleri ile ikili enfeksiyon tespit edilmiştir. Dalama'dan Mart ayında bir hayvan, Eylül ayında ise toplanan iki hayvana ait örneklerde *A. marginale* / *A. centrale* / *A. phagocytophilum* türleri ile üçlü bir enfeksiyon tespit edilmiştir.

Çalışmanın yapıldığı zaman dilimi içerisinde sığırlar üzerinden toplam 186 adet kene toplanmıştır. Toplanan keneler morfolojik

Tablo 2. Odaklardan toplanan kan örneklerinde belirlenen türler

| Odaklar | Örnekleme yapılan aylarda pozitif örnek sayısı / toplam örnek sayısı | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--|-------|--------|-------|--------|----------------------------------|-------|--------|-------|--------|---------------------------------|-------|--------|------|--------|---|-------|--------|-------|--------|---------------------|-------|-------|----------|
| | Anaplasma/Ehrlichia soy PZR | | | | Toplam | A. marginale türe özgü tekli PZR | | | | Toplam | A. centrale türe özgü tekli PZR | | | | Toplam | A. phagocytophilum türe özgü nested PZR | | | | Toplam | Miks enfeksiyonlar* | | | |
| | Haziran | Eylül | Aralık | Mart | | Haziran | Eylül | Aralık | Mart | | Haziran | Eylül | Aralık | Mart | | Haziran | Eylül | Aralık | Mart | | AM/AC | AM/AP | AC/AP | AM/AC/AP |
| O.bükü | 3/45 | 2/48 | 6/66 | 2/20 | 13 | 2/45 | 0/48 | 0/66 | 0/20 | 2 | 0/45 | 0/48 | 0/66 | 0/20 | 0 | 1/45 | 1/48 | 4/66 | 1/20 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Söke | 4/50 | 33/61 | 24/32 | 31/39 | 92 | 0/50 | 0/61 | 1/32 | 1/39 | 2 | 0/50 | 2/61 | 0/32 | 0/39 | 2 | 4/50 | 23/61 | 20/32 | 28/39 | 75 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Dalama | 24/48 | 33/48 | 19/26 | 21/29 | 97 | 4/48 | 17/48 | 8/26 | 13/29 | 42 | 3/48 | 6/48 | 1/26 | 2/29 | 12 | 6/48 | 27/48 | 15/26 | 16/29 | 64 | 3 | 30 | 5 | 3 |
| A.ova | 37/46 | 40/54 | 20/34 | 29/33 | 126 | 1/46 | 1/54 | 0/34 | 1/33 | 3 | 4/46 | 4/54 | 4/34 | 2/33 | 14 | 15/46 | 33/54 | 17/34 | 26/33 | 91 | 0 | 3 | 8 | 0 |
| TOPLAM | 68 | 108 | 69 | 83 | | 5 | 18 | 9 | 15 | | 7 | 12 | 5 | 4 | | 26 | 84 | 56 | 71 | | 3 | 33 | 15 | 3 |

(*) AM/AC; A. marginale ve A. centrale, AM/AP; A. marginale ve A. phagocytophilum, AC/AP; A. centrale ve A. phagocytophilum, AM/AC/AP; A. marginale, A. centrale ve A. phagocytophilum ile oluşan miks enfeksiyonları göstermektedir. Not: Dalama'da A. marginale tespit edilen yedi, Dalama ve Akçaova'da A. centrale tespit edilen sırasıyla altı ve yedi örnek ile A. phagocytophilum tespit edilen Osmanbükü'nde iki, Söke'de 23, Akçaova'da 11 ve Dalama'da 17 örnek farklı hayvanlardan alınan örnekler olup, bunun dışındaki pozitiflikler aynı hayvanların farklı gidişlerinde belirlenmiştir. O. bükü; Osmanbükü, A. ova; Akçaova



Şekil 1. (A1-3); *Anaplasma/Ehrlichia* soyuna ait tüm türlerde ortak korunmuş gen bölgesine spesifik EC9/12A primerleri ile yapılan soy PZR ürünleri (A1) kullanılarak yapılan *A. phagocytophilum* (A2) ve *A. bovis* *A. phagocytophilum* (A3) türlerine özgü nested PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik moleküler büyüklük belirleyici (Thermo Scientific Corp.); 1 ile 7 arasındaki kuyucuklarda farklı DNA örnekleri; 8. kuyuda pozitif kontrol; 9. dH₂O konulmuştur. *A. bovis* (A2) nested PZR'de 1 ile 8 arasındaki kuyucuklarda farklı pozitif DNA örnekleri; 9. dH₂O yer almaktadır. (B1-3); *A. marginale* (B1) ve *A. centrale* (B2) türlerine özgü primer çiftleri ile *Anaplasma/Ehrlichia* soyuna ait tüm türlerde ortak korunmuş gen bölgesine spesifik EHR16SD F/R primerleri (B3) kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik moleküler büyüklük belirleyici (Thermo Scientific Corp.); 1 ile 7 arasındaki kuyucuklarda farklı DNA örnekleri; 8. kuyuda pozitif kontrol; 9. dH₂O konulmuştur.

özelliklerine göre cins ve tür düzeyinde tanımlanmıştır. Tanımlanmış kenelerden en fazla *Hyalomma marginatum* (n=86) ve *H. excavatum* (n=86) türüne rastlanırken bu türleri *Rhipicephalus turanicus* (n=13) ve *H. anatolicum* (n=3) takip etmiştir. Toplanan kene örneklerinden tür düzeyinde oluşturulan havuzlarda PZR ile belirlenen türler Tablo 3'de verilmiştir.

Çoğaltılan PZR Ürünlerinin Dizilim Analizleri

İlgili primer çiftleri (MAR1b, mpb58 ve SSAP) kullanılarak PZR ve nested PZR ile çoğaltılan, sırasıyla *A. marginale*, *A. centrale* ve *A. phagocytophilum* türlerine özgü ürünlerin sekans analizleri sonucunda elde edilen nükleotid dizilim sonuçları, nükleotid blast programı kullanılarak NCBI veri tabanında kontrol edilmiştir. MAR1b primer çifti ile çoğaltılan 265 bp'lik ürün *A. marginale*'nin msp1β genine %100, Mpb58 primer çifti kullanılarak çoğaltılan 904 bp'lik ürün *A. centrale*'nin yüzey antijen proteini genini kodlayan bölgesine % 99, SSAP primer çifti ile nested PZR ile çoğaltılan 641 bp'lik ürün *A. phagocytophilum*'un 16S rRNA genine % 98 oranında benzerlik göstermiştir (veriler bu yayına eklenmemiştir).

TARTIŞMA

Tropikal ve subtropikal bölgelerde enzootik ve sporadik olarak görülen ve keneler tarafından nakledilen anaplasmosis ekonomik kayıplara neden olması yönünden önemli bir hastalıktır (4, 5, 29). Sığırlarda önemli ekonomik kayıplara yol açan *Anaplasma* türleri arasında *A. phagocytophilum*, *A. marginale* ve *A. bovis* yer almaktadır (27, 30). Sığırlarda görülen diğer bir tür olan *A. centrale* ise, virülensindeki farklılıklara rağmen *A. marginale* ile morfolojik olarak benzerlik göstermektedir (9, 31, 32). Çiftlik hayvanlarında ve daha az derecede de insanlarda bu etkenlerin patojenik aktiviteleri birbirleri ile bağlantılıdır (12). *Anaplasma* türleri tarafından oluşturulan akut hastalıktan kurtulan hayvanlar re-enfeksiyonlara karşı direnç geliştirerek, hastalık etkenlerini kalıcı olarak vücutlarında taşırlar (31). Bu taşıyıcı hayvanlar ara konak keneler yoluyla enfeksiyonun duyarlı hayvanlara naklinde en önemli rezervuarlardır (31) ve bu taşıyıcı hayvanların tespiti hastalığa karşı uygulanacak olan korunma ve/veya kontrol programları açısından önemlidir. Sığırlarda hastalık oluşturan *Anaplasma* türlerinin tespitinde kullanılan moleküler yöntemler yüksek sensivite ve spesifitesinden dolayı en duyarlı tanı yöntemleridir (16, 17, 18, 33, 34). Soy PZR'ı ile elde edilen sonuçlar tür bazında *Anaplasma* türlerinin tespiti için kullanılmaktadır (15). Bu çalışmada, türlere özgü primerler kullanılarak etkenlerin karakterizasyonu yapılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla *A. marginale* ve *A. centrale* için tür tespitinde daha fazla duyarlı olduğu belirlenmiş

Tablo 3. Sığırlardan toplanan kene örneklerinden tür düzeyinde oluşturulan havuzlardan elde edilen sonuçlar

| Kene Havuzları | PZR ile belirlenen türler | | | | | Toplandığı Yer | Tür | Cins ve Sayısı |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------|--------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------------|----------------|
| | | <i>A. marginale</i> | <i>A. centrale</i> | <i>A. bovis</i> | <i>A. phago</i> | | | |
| K1 | + | - | - | - | + | Dalama | <i>H. marginatum</i> | 10 ♂ |
| K2 | + | + | - | - | - | Dalama | <i>H. marginatum</i> | 10 ♀ |
| K3 | - | - | - | - | - | Dalama | <i>H. marginatum</i> | 10 ♂ |
| K4 | - | - | - | - | - | Akçaova | <i>H. marginatum</i> | 5 ♂ |
| K5 | + | - | - | - | + | Akçaova | <i>H. excavatum</i> | 23 ♂ |
| K6 | + | - | - | - | - | Osmanbükü | <i>H. excavatum</i> | 11 ♂ |
| K7 | + | - | - | - | - | Osmanbükü | <i>H. excavatum</i> | 10 ♀ |
| K8 | + | - | - | - | - | Osmanbükü | <i>H. excavatum</i> | 10 ♂ |
| K9 | + | - | - | - | + | Dalama | <i>H. marginatum</i> | 10 ♀ |
| K10 | + | - | - | - | + | Dalama | <i>H. marginatum</i> | 11 ♂ |
| K11 | + | + | - | - | + | Dalama | <i>H. marginatum</i> | 10 ♂ |
| K12 | - | - | - | - | - | Osmanbükü | <i>H. excavatum</i> | 10 ♂ |
| K13 | + | - | - | - | - | Osmanbükü | <i>H. excavatum</i> | 10 ♂ |
| K14 | - | - | - | - | - | Osmanbükü | <i>H. excavatum</i> | 8 ♀ |
| K15 | + | - | - | - | - | Osmanbükü | <i>H. marginatum</i> | 2 ♀ |
| K16 | - | - | - | - | - | Osmanbükü | <i>H. anatolicum</i> | 3 ♂ |
| K17 | - | - | - | - | - | Dalama | <i>R.turanicus</i> | 13 ♀ |
| K18 | + | + | - | + | - | Dalama | <i>H. excavatum</i> | 2 ♂ |
| K19 | + | + | - | - | - | Dalama | <i>H. marginatum</i> | 8 ♀ |
| K20 | + | - | - | - | - | Dalama | <i>H. marginatum</i> | 10 ♂ |
| TOPLAM (♀ ve ♂) 186 (51♀ ve 135♂) | | | | | | | | |

(17, 18) major yüzey proteinini (*mcp*) kodlayan gen bölgesine spesifik primerler seçilerek PZR'lar yapılmış, *A. bovis* ve *A. phagocytophilum* türlerinde ise 16S gen bölgesi çoğaltıldıktan sonra duyarlılığı daha önceki çalışmalarda belirlenmiş (33) türlere spesifik primerler ile nested PZR yapılarak bölgedeki *Anaplasma* türleri ortaya konmuştur. Türkiye'de *Anaplasma* türlerinin tespiti ve karakterizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yapılan çalışmalar daha çok *A. marginale* ve *A. centrale*'nin tespitine yöneliktir (21,22, 28). Çakmak tarafından (21) 1990 yılında Ankara Beytepe'de sığırlarda kan parazitlerinin varlığını belirlemek için yapılan CF (komplement fikzasyon) testi ile 4 serum örneğinde *A. marginale*'ye spesifik antikorların varlığı tespit edilmiştir. Afyon ilinde bir sığırcılık işletmesinde ELISA yöntemi ile test edilen 506 sığır kan serumu örneğinin 312'si *A. marginale*'ye spesifik antikorlar yönünden pozitif bulunmuştur (22). Kullanılan serolojik testlerin *Anaplasma* türleri arasındaki antijenik benzerliklerden dolayı aynı hayvanda bulunabilen eş zamanlı enfeksiyonlarda tür ayırımına olanak vermediği bilinmektedir (2). Bu türlü eş zamanlı enfeksiyonların belirlenmesinde yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip moleküler yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Gökçe ve ark. (25) Karadeniz Bölgesinde yaptıkları çalışmada, mikroskopik, moleküler ve serolojik yöntemler ile *A. phagocytophilum*'u tespit etmeye çalışmışlardır. Çalışma neticesinde,

toplanan 720 sığır kan örneğinin mikroskopik bakı ile 73 tanesinde, IFAT ile 110 tanesinde seropozitiflik tespit edilmesi ve PZR ile sadece toplanan örneklerin 27'sinde *A. phagocytophilum* bulunması mikroskopik ve serolojik testlerin eş zamanlı bulunabilen diğer *Anaplasma* türlerinin belirlenmesinde yeterli özgüllüğe sahip olmadığını göstermiştir. Bunun dışında Karadeniz bölgesindeki sığırlarda yürütülen diğer çalışmalarda da *A. marginale* ve *A. centrale*'nin tespit edildiği bildirilmiştir (20, 27). Karagenç ve ark. (28) Aydın yöresi sığırlarında RLB (reverse line blot) tekniği kullanarak moleküler düzeyde *Theileria*, *Babesia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* türlerini belirlemeye çalışmışlardır. RLB testi sonucunda, 120 kan örneğinin % 13,3'ünde *A. centrale*, % 6,6'sında da *A. marginale*'ye rastlanmıştır (28).

Aydın iline bağlı ilçelerde yapılan bu çalışmada, *A. marginale* en fazla Dalama'da tespit edilirken diğer bölgelerde *A. marginale* enfeksiyonunun oldukça az olduğu görülmüştür. Kan toplanan bölgelerde *A. marginale* Mart ve Eylül aylarında iki kez pik yapmış ve örnekleme yapılan diğer aylarda pozitiflik düşmüştür (Tablo 2). *A. centrale* türü ise en fazla Akçaova ve Dalama'da belirlenmiştir. Örnekleme dönemlerindeki yaygınlığına bakıldığında *A. centrale* enfeksiyonu Mart ayından itibaren yükselmeye başlayarak Eylül ayında pik seviyesine ulaşmış ve daha sonra

tekrar azalmıştır. Yapılan incelemelerde, Osmanbükü'nde *A. centrale* hiç tespit edilmezken, *A. marginale*'de türü sadece Haziran ayında belirlenebilmiştir (Tablo 2). Örneklemelerde çalışma yapılan bölgelerde enfeksiyon oranının dalgalı seyretmesi; (i) bölgedeki hayvan popülasyonunun; hayvan hareketleri, ölüm, satım vb. gibi nedenlerle sürekli değişmesi, (ii) bölgede düzenli kene mücadelesi uygulamaları, (iii) bakım besleme koşulları ile (iv) hayvanlardaki dalgalı parazitemi seviyeleri ile doğrudan ilişkilidir. Örneklerin toplanma zamanı enfeksiyonlara yol açan etkenlerin belirlenmesinde büyük öneme sahiptir. Anaplasmosis'de hastalığın akut dönemini atlatan hayvanlar etkeni kalıcı olarak vücutlarında taşırlar, ancak bu hayvanlarda düşük seviyelerden, tespit edilemeyen seviyelere kadar değişen devirli bir parazitemi görülür (31). Taşıyıcı hayvanlardaki parazitemi seviyesi yıl içinde belli dönemlerde artarken belli dönemlerde tespit edilemeyen seviyelere kadar azalma eğilimi göstermektedir. Bu çalışmada, bazı bölgelerde *A. centrale* ve *A. marginale* türlerinin tespit edilememiş olması örnek toplanan bölgedeki etkenlerin düşük prevalansından kaynaklanabileceği gibi, parazitemi seviyesindeki dalgalanmalardan da kaynaklanmış olabilir. Hastalıkların prevalansı hakkında tam bir bilgi sahibi olunması için daha geniş bir zaman diliminde, belli aralıklarla örneklemenin yapılarak bunların değerlendirilmesi gerekmektedir.

Nötrofil, eozinofil ve monositlerde obligat intracellüler yaşayan *A. phagocytophilum* (35) tarafından oluşturulan TBF (tick-borne fever) evcil ve yabani ruminantlarda görülen patojen bir türdür. *A. phagocytophilum*'un sadece veteriner hekimlikte değil aynı zamanda halk sağlığı açısından da önemli olup etkenin varyantları, insanlarda granülositik anaplasmosis'e (HGA) neden olmaktadır (11, 2). *A. phagocytophilum* ABD'nin genelinde, İngiltere, Norveç ve İskandinavya'nın da içerisinde olduğu kuzey, orta ve güney Avrupa ile Asya'da endemik olarak görülmektedir. Türkiye'de Karadeniz Bölgesinde yapılan çalışmalarda, *A. phagocytophilum* türünün varlığı tespit edilmiştir (20, 25, 27). Karadeniz bölgesinde RLB ile incelenen örneklerin 11'inde (% 2,8) *A. marginale*, dördünde (% 1) *A. centrale* ve dördünde de (% 1) *A. phagocytophilum* tespit edildiği bildirilmiştir (20). Aktaş ve Özübek (27) yapıları bir çalışmada yine Karadeniz bölgesindeki sığırlardan aldıkları kan örneklerinde ilk kez klinik olarak *A. phagocytophilum* enfeksiyonunu tespit etmişler, aynı çalışma ile Türkiye'de ilk kez sığırlarda *A. bovis* tespit edildiğini bildirmişlerdir (27). Bu çalışmada, *A. phagocytophilum*'a Aydın iline bağlı kan toplanan ilçelerden Söke, Dalama ve Akçaova'da yüksek oranda rastlanmıştır (Tablo 2). En yoğun *A. phagocytophilum* enfeksiyonu Akçaova'da (91 adet pozitif) belirlenmiş ve pik seviyesine Eylül ayında ulaştığı belirlenmiştir.

Küçük ruminantlarda görülen *A. ovis* ve *A. phagocytophilum* enfeksiyonlarının endemik olduğu Slovakya gibi ülkelerde hayvanlarda bu iki tür tarafından oluşturulan eş zamanlı enfeksiyonlara rastlanılabilmektedir (35). Klinik olarak hastalık tablosu gösteren sığırlarda RLB ile yapılan incelemelerde toplanan örneklerin % 80'inde *A. phagocytophilum*'un *A. marginale*, *A. centrale*, *Ehrlichia* sp. Omatjenne türleri ile birlikte çoklu enfeksiyon oluşturduğu belirlenmiştir (27). Aydın yöresi sığırlarında *A. centrale*, *A. marginale* ve *Ehrlichia* sp. Omatjenne türlerinin tekli ve miks enfeksiyonların varlığı bilinmektedir (28). Ancak, *A. phagocytophilum* ve *A. bovis* türleri ile ilgili veri bulunmamaktadır. Bu çalış-

mada kan toplanan tüm bölgelerde (Osmanbükü, Söke, Dalama ve Akçaova) hayvanlarda *A. centrale* ve *A. marginale*'nin yanında *A. phagocytophilum* türünün tekli ve miks enfeksiyon tarzında sığırlarda yaygın olarak görüldüğü tespit edilmiştir. Ülkemiz'de *A. bovis*'in varlığı (27) moleküler olarak ortaya konulmuş olmakla birlikte Aydın yöresinde yapılan bu çalışmada *A. bovis*'a rastlanılmamıştır.

Anaplasma türlerinin naklinde rol oynayan keneler (*Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Demacenter*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*), *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Ornithodoros*) Türkiye'de yaygın olarak görülmektedir (36, 37, 38). Ege Bölgesinde de *A. centrale* ve *A. marginale*'ye vektörlük edebilen ixodid keneler daha çok ilkbahar ve yaz aylarında aktivite göstermektedir (37). *A. phagocytophilum* özellikle *Ixodes ricinus* başta olmak üzere *Ixodes* soyuna bağlı çok sayıda kene türü tarafından taşınmakta ve bulaşık meralarda otlatılan evcil ve yabani ruminantlarda oluşturduğu immunsupresif enfeksiyonlara bağlı önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (39). Türkiye'de son yıllarda yapılan çalışmalarda *A. phagocytophilum* sığır, insan ve barınaklardan toplanan ixodid kenelerde bildirilmiştir (11, 20, 23, 24). Karadeniz bölgesinde yürütülen bir çalışmada sığırlardan toplanan *Ixodes ricinus* türlerinde RLB tekniği ile en yoğun olarak *A. phagocytophilum* türü, sonrasında da *A. centrale* türü tespit edilmiştir (23). Bu çalışmada, sığırların üzerinden toplanan kenelerden hazırlanan 20 kene havuzundan 14'ü soy PZR'ı ile pozitif bulunmuştur (Tablo 3). Türleri özgü spesifik primerler kullanılarak yapılan nested PZR'da ise *H. excavatum* (K5) ve *H. marginatum*'un (K1, K9 ve K10) bulunduğu 4 havuzda sadece *A. phagocytophilum*, *H. marginatum*'un bulunduğu iki havuzda (K2 ve K19) sadece *A. marginale*, *H. excavatum* (K18) ve *H. marginatum*'un (K11) bulunduğu iki havuzda eş zamanlı olarak *A. marginale* ve *A. phagocytophilum* tespit edilmiştir. Kene havuzlarında *A. centrale*'ye rastlanmamıştır. Ayrıca soy PZR'da pozitif çıkan ve *H. excavatum* (K6-8 ve K13) ile *H. marginatum*'un (K15 ve K20) bulunduğu altı kene havuzunda, türlere özgü primerler kullanılarak yapılan nested PZR'da negatif sonuç alınmıştır. Bu durum, incelenen havuzlardaki kenelerin muhtemelen farklı *Anaplasma/Ehrlichia* türleri ile enfekte olduğunu göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda *A. marginale* ve *A. phagocytophilum* türleri *D. marginatus*, *R. bursa* ve *H. marginatum*'da belirlenmiştir (40). Kenelerde farklı *Anaplasma* türleri ile eş zamanlı enfeksiyonlara sık rastlandığı bildirilmekte ve bu durum gerek veteriner hekimlik gerekse de halk sağlığı açısından risk oluşturmaktadır (40). *A. phagocytophilum*'un ana vektörlerinin *Ixodes* türleri olmasına rağmen (41) bu çalışmada *A. phagocytophilum* pozitif çıkan hayvanlar üzerinden toplanan kene türleri *Hyalomma* türleridir. *Hyalomma* türlerindeki pozitifliğin enfekte hayvanlardan kan emme esnasında kazanılmış olma olasılığı oldukça yüksektir, bununla beraber ileriki dönemlerde yapılacak olan çalışmalarda *Ixodes* türlerinin dışında *A. phagocytophilum*'a vektörlük eden kene türlerinin belirlenmesi için yapılacak çalışmalar, hayvan sağlığı için olduğu kadar insan sağlığı içinde önem taşımaktadır.

SONUÇ

Bu çalışmada Aydın yöresinde daha önce yapılan çalışmalarda belirlenenin aksine *A. phagocytophilum* türünün *A. marginale* ve *A. centrale*'ye oranla daha yüksek olarak bulunduğu belirlenmiştir.

Bununla birlikte, incelenen örneklerde *A. bovis*'e rastlanmamıştır. Elde edilen sonuçlar ileride yapılacak çalışmalarda bu türlerin Ege bölgesinde yaygınlığının tespit edilerek hayvanlarda direk ve indirek etkilerinin belirlenmesi, ayrıca *A. phagocytophilum* kaynaklı enfeksiyonların hayvanlar üzerindeki primer ve/veya sekonder patojenik etkilerinin araştırılması açısından bir ön çalışma olarak da önem arz etmektedir. Diğer yünden hastalık etkenlerinin naklinde rol oynayan kene türlerinin belirlenerek bölgesel bir risk haritası oluşturulması yönünde de ileride yapılacak çalışmalara yardımcı olabilmesi açısından önemlidir. Bu çalışma ile Aydın yöresinde *Anaplasma* türleri ve karakterizasyonları belirlenmiş olup bu tür çalışmaların Türkiye geneline yayılması, her bölgedeki türlerin ve bu türlerin antijenik polimorfizimlerinin belirlenmesi ayrıca taşıyıcı kenelerin ortaya konması, anaplazmozisin neden olduğu kayıpların önlenmesi ve hastalığın kontrolünde uygulanacak stratejileri belirleme konularına dolayısıyla da Türkiye ekonomisine katkı sağlayacaktır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 07.02.2006 tarih ve B.30.2.ADÜ.0.06.00.00/124-HEK/2006/0022 numaralı kararı gereğince yapılmıştır.

Hasta Onamı: Bu çalışma için hasta onamına gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağimsız.

Yazar Katkıları: Fikir - M.H., H.B.B., S.B.; Tasarım - M.H., T.K., H.E.; Denetleme - M.H., H.B.B., A.H.Ü.; Malzemeler - T.K., H.E.; Veri Toplanması ve/veya işleme - M.H., H.B.B., S.B.; Analiz ve/veya Yorum - M.H., H.B.B., S.B.; Literatür taraması - T.K., H.E., A.H.Ü.; Yazıyı Yazan - M.H., H.B.B.; Eleştirel İnceleme - S.B., T.K., H.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi -Bilimsel Araştırma Projeleri-Veteriner Parazitoloji-Doktora projesi; 2011-0001 (ADU-BAP VPR- DR- 2011-0001) ile desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval of this study was received from Adnan Menderes University Local Ethic Committee of Animal Experiment dated at 7.02.2006 in accordance with decision number B.30.2.ADÜ.0.06.00.00/124-HEK/2006/0022.

Informed Consent: Not required in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author contributions: Concept - M.H., H.B.B., S.B.; Design - M.H., T.K., H.E.; Supervision - M.H., H.B.B., A.H.Ü.; Materials - T.K., H.E.; Data Collection and/or Processing - M.H., H.B.B., S.B.; Analysis and/or Interpretation - M.H., H.B.B., S.B.; Literature Review - T.K., H.E., A.H.Ü.; Writer - M.H., H.B.B.; Critical Review - S.B., T.K., H.E.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This study was financially supported by Adnan Menderes University- Scientific Research Programs -Veterinary Parasitology-PhD Project No; 2011-0001 (ADU-BAP VPR- DR- 2011-0001)

KAYNAKLAR

- Dumler JS, Rikihisa Y, Dasch GA. Family II. Anaplasmataceae. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2005; 117-125.
- de la Fuente J, Torina A, Caracappa S, Tumino G, Furlá R, Almazán C, et al. Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. Veterinary Parasitology 2005; 133: 357-62. [CrossRef]
- Rodríguez SD, García Ortiz MA, Jiménez Ocampo R, Vega y Murguía CA. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. Infect Genet Evol 2009; 9: 1092-101. [CrossRef]
- Zivković Z, Esteves E, Almazán C, Daffre S, Nijhof AM, Kocan KM, et al. Differential expression of genes in salivary glands of male *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in response to infection with *Anaplasma marginale*. BMC Genomics 2010; 11: 186 [CrossRef]
- Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. Vet Parasitol 2008; 155: 1-9. [CrossRef]
- Stuen S, Bergstrom K, Palmer E. Reduced weight gain due to subclinical *Anaplasma phagocytophilum* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) infection. Experimental and Applied Acarology 2002; 28: 209-15. [CrossRef]
- Stuen S, Nevlund S, Moum T. Fatal cases of tick-borne fever (TBF) in sheep caused by several 16S rRNA gene variants of *Anaplasma phagocytophilum*. Annals of the New York Academy of Science 2003; 990: 433-4. [CrossRef]
- Jongejan F, Uilenberg G. Ticks and control methods. Rev Sci Tech 2009; 13: 1201-26.
- Kocan KM, de la Fuente J, Guglielme AA, Melen-dez RD. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 698-712. [CrossRef]
- Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Parasitol 2010; 167: 108-22. [CrossRef]
- Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. Clin Infect Dis 2007; 45 Suppl 1:S45-51. [CrossRef]
- Rymaszewska A, Grenda S. Bacteria of the genus *Anaplasma*- characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. Vet Med 2008; 53: 573-84.
- Kocan KM, Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet Parasitol 2010; 167: 95-107. [CrossRef]
- Paddock CD, Childs JE. *Ehrlichia chaffeensis*: a Prototypical Emerging Pathogen. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 37-64. [CrossRef]
- Noaman V, Shayan P. A new PCR-RFLP method for detection of *Anaplasma marginale* based on 16S rRNA. Vet Res Commun 2010; 34: 43-50. [CrossRef]
- Brown GK, Martin AR, Roberts TK, Aitken RJ. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. Aust Vet J 2001; 79: 554-8. [CrossRef]
- Shkap V, Molad T, Fish L, Palmer G. Detection of the *Anaplasma centrale* vaccine strain and specific differentiation from *Anaplasma marginale* in vaccinated and infected cattle. Parasitol Res 2002; 88: 546-52. [CrossRef]
- Bilgiç HB, Karageç T, Simuunza M, Shiels B, Tait A, Eren H et al. Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. Exp Parasitol 2013; 133: 222-9. [CrossRef]
- Molad T, Mazuz ML, Fleiderovitz L, Fish L, Savitsky I, Krigel Y, et al. Molecular and serological detection of *A. centrale*- and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. Vet Microbiol 2006; 113: 55-62. [CrossRef]
- Aktas M, Altay K, Dumanlı N. Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey. Ticks Tick Borne Dis 2011; 2: 62-5. [CrossRef]
- Çakmak A. Ankara Yöresinde Bir Sığır Sürüsünde Hemoparazitlerin İnsidensinin Araştırılması. A. Ü. Vet. Fak. Derg. 1990; 37(3): 632-45.
- Sevinç F, Derinbay Ö. Bir Sığırçılık İşletmesinde Anaplazmozis Problemi. XIV. Ulusal Parazitoloji Kongresi; İzmir: 2005. p. 133-134.
- Aktas M, Altay K, Ozubek S, Dumanlı N. A survey of ixodid ticks feeding on cattle and prevalence of tick-borne pathogens in the Black Sea region of Turkey. Vet Parasitol 2012; 187: 567-71. [CrossRef]

24. Aktas M. A survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens. *Vet Parasitol* 2014; 200: 276-83. [\[CrossRef\]](#)
25. Gökçe Hİ, Genç O, Akça A, Vatansever Z, Unver A, Erdoğan HM. Molecular ve Serological Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* Infection of Farm Animals in The Black Sea Region of Turkey. *Acta Vet Hung* 2008; 56: 281-92. [\[CrossRef\]](#)
26. Sen E, Uchishima Y, Okamoto Y, Fukui T, Kadosaka T, Ohashi N, et al. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks from Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of north-western Turkey. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011; 2: 94-8. [\[CrossRef\]](#)
27. Aktas M, Özübek S. Bovine anaplasmosis in Turkey: First laboratory confirmed clinical cases caused by *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Microbiol* 2015; 178: 246-51. [\[CrossRef\]](#)
28. Karagenc TI, Bilgic HB, Hoşgor M, Selek N, Aypak S, Eren H. Aydın Yöresi Sığırlarında RLB Tekniği Kullanılarak *Theileria*, *Babesia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia* Türlerinin Belirlenmesi. XIV. Ulusal Parazitoloji Kongresi; İzmir: 2005. p. 262-263.
29. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne Rickettsia. *Parasitol* 2004; 129: 285-300. [\[CrossRef\]](#)
30. Inokuma H. Vectors and reservoir hosts of Anaplasmataceae. 2007; p. 199-212. In D. Raoult and P. Parola (eds.), *Rickettsial Diseases*, Taylor & Grancis Group, LLC., New York. [\[CrossRef\]](#)
31. Kocan KM, Edmour F, Blouin EF and Barbet AF. Anaplasmosis Control Past, Present, and Future. *Ann N Y Acad* 2000; 916:501-9. [\[CrossRef\]](#)
32. Rajput ZI, Hu SH, Arijo AG, Habib M, Khalid M. Comparative study of *Anaplasma* parasites in tick carrying buffaloes and cattle. *J Zhejiang Univ Sci* 2005; 6: 1057-62. [\[CrossRef\]](#)
33. Kawahara M, Rikihisa Y, Lin Q, Isogai E, Tahara K, Itagaki A, et al. 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 Microbio* 2006; 42: 1102-9. [\[CrossRef\]](#)
34. Noaman V, Shayan P. Molecular Detection of *Anaplasma bovis* in Cattle from Central Part of Iran. *Vet Res* 2010; 1: 117-122.
35. Derdákóvá M, Stefancíková A, Spitalská E, Taragelová V, Košťálová T, Hrklová G, et al. Emergence and genetic variability of *Anaplasma* species in small ruminants and ticks from Central Europe. *Vet Microbiol* 2011; 153: 293-8. [\[CrossRef\]](#)
36. Aydın L, Bakırcı S. Geographical distribution of ticks in Turkey. *Parasitol Res* 2007; 101: 163-6 [\[CrossRef\]](#)
37. Bakırcı S. Batı Anadolu Bölgesi Sığırlarında Görülen Kene Türleri ve Yaygınlığı. Bursa: Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2009.
38. Bursalı A, Keskin A, Tekin S. A review of the ticks (Acari: Ixodidae) of Turkey: species diversity, hosts and geographical distribution. *Exp Appl Acarol* 2012; 57: 91-104 [\[CrossRef\]](#)
39. Bakken JS, Dumler JS. Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis.* 2000; 31: 554-60. [\[CrossRef\]](#)
40. de la Fuente J, Ruiz-Fons VNF, Estrada-Pena JVA, Kocan M, Gortazar PMC. Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from European wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. *Eur J Wildl Res* 2004; 50: 187-96. [\[CrossRef\]](#)
41. Aktaş M, Vatansever Z, Altay K, Aydın MF, Dumanlı N. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from Turkey. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010; 104: 10-5. [\[CrossRef\]](#)