

**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PARAZİTOLOJİ (VETERİNER) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**EGE BÖLGESİ’NDEKİ ATLARDA *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**HASAN TOKER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ**

**AYDIN–2022**

**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PARAZİTOLOJİ (VETERİNER) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**EGE BÖLGESİ’NDEKİ ATLARDA *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**HASAN TOKER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr.Tülin KARAGENÇ**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-20017 proje numarası ile desteklenmiştir

**AYDIN–2022**

# KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji (Veteriner) Yüksek Lisans Programı öğrencisi Hasan TOKER tarafından hazırlanan “Ege Bölgesi’ndeki atlarda *Anaplasma phagocytophilum* varlığının araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07/02/2022

Üye (T.D.) : Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi …………….

Üye : Prof. Dr. Serkan BAKIRCI Aydın Adnan Menderes Üniversitesi …………...

Üye : Dr.Öğr.Üyesi Ahmet Hakan ÜNLÜ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi ………………….

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ……………..……..…tarih ve …………………………sayılı oturumunda alınan ……………………nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü

# 

# TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmamın başından sonuna kadar her aşamasında bana destek olan tez danışmanım Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ, Adnan Menderes Üniversitesi Parazitoloji Ana Bilim Dalı Bölüm Başkanı Prof. Dr. Hasan EREN, Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Serkan BAKIRCI ve Doç. Dr. Hüseyin Bilgin BİLGİÇ’e teşekkür ederim. Ayrıca çalışmamın analiz bölümünde yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Metin PEKAĞIRBAŞ, Hakan KANLIOĞLU, Beril KOÇ ve Heycan Berk AYDIN’a teşekkürü borç bilirim. Hayatımın her anında desteklerini esirgemeyen aileme, çalışmalarım sırasında her koşulda yanımda yer aldığı için eşim Selinay TOKER’e ve varlığı benim için en büyük motivasyon kaynağı olan canım kızım Bilge Mevsim TOKER’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

[KABUL VE ONAY i](#_Toc96607987)

[TEŞEKKÜR ii](#_Toc96607988)

[İÇİNDEKİLER iii](#_Toc96607989)

[SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ v](#_Toc96607990)

[RESİMLER DİZİNİ vii](#_Toc96607991)

[TABLOLAR DİZİNİ viii](#_Toc96607992)

[ŞEKİLLER DİZİNİ ix](#_Toc96607993)

[ÖZET x](#_Toc96607994)

[ABSTRACT xii](#_Toc96607995)

[1. GİRİŞ 1](#_Toc96607996)

[2. GENEL BİLGİLER 3](#_Toc96607997)

[2.1. *Anaplasma phagocytophilum* 3](#_Toc96607998)

[2.1.1. Tarihsel Bakış 3](#_Toc96607999)

[2.1.2. Taksonomi ve Özellikleri 4](#_Toc96608000)

[2.1.3. Konakçı ve Vektörler 5](#_Toc96608001)

[2.1.4. Gelişim Döngüsü ve Bulaşma 7](#_Toc96608002)

[2.1.5. Epidemiyolojisi 8](#_Toc96608003)

[2.1.6. Patojen Mekanizması 15](#_Toc96608004)

[2.1.7. Klinik Semptomlar ve Laboratuvar Bulguları 16](#_Toc96608005)

[2.1.8. Tanı ve Tedavi 17](#_Toc96608006)

[2.2. Atlarda *Anaplasma phagocytophilum* Varlığı Üzerine Çalışmalar 19](#_Toc96608007)

[2.3. Türkiye’deki Atlarda *Anaplasma phagocytophilum* Varlığı Üzerine Çalışmalar 23](#_Toc96608008)

[3. GEREÇ VE YÖNTEM 25](#_Toc96608009)

[3.1. Gereç 25](#_Toc96608010)

[3.1.1. Çalışma Alanı 25](#_Toc96608011)

[3.1.2. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması 26](#_Toc96608012)

[3.2. Yöntem 26](#_Toc96608013)

[3.2.1. DNA Ekstrasyonu 26](#_Toc96608014)

[3.2.2. Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu 27](#_Toc96608015)

[3.2.3. PCR Ürününün Klonlanması ve DNA Dizileme Analizi 29](#_Toc96608016)

[4. BULGULAR 31](#_Toc96608017)

[4.1. Klonlama ve Dizileme Analiz Sonuçları: 31](#_Toc96608018)

[4.2. DNA Dizilim Sonuçları 32](#_Toc96608019)

[4.3. PCR Testi Bulguları 33](#_Toc96608020)

[5. TARTIŞMA 35](#_Toc96608021)

[6. SONUÇ VE ÖNERİLER 40](#_Toc96608022)

[KAYNAKLAR 41](#_Toc96608023)

[BİLİMSEL ETİK BEYANI 63](#_Toc96608024)

[ÖZ GEÇMİŞ 64](#_Toc96608025)

# SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

**ABD :** Amerika Birleşik Devletleri

**Bcl-2 :** B Hücreli Lenfoma 2

**CTP :** Sitidin Trifosfat

**DC :** Çekirdek Form

**DNA :** Deoksiribo Nükleik Asit

**EDTA :** Etilendiamin Tetraasetik Asit

**EGA :** At Granülositik Anaplazmozu

**ELISA :** Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi (Enzyme-Linked Immuno

Sorbent Assay)

**GTP :** Guanozin Trifosfat

**HCl :** Hidroklorik Asit

**HGA :** İnsan Granülositik Anaplazmozu

**HL-60 :** Promiyelositik Hücre

**IFA**  **:** İndirek Floresan Antikor Testi

**Ig G :** İmmünoglobülin G

**μg :** Mikrogram

**MgCl2 :**Magnezyum Klorür

**µmol :** Mikromol

**NADPH :** Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat + Hidrojen Atomu

**NaCl :** Sodyum Klorür

**PCR :** Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

**pH :** Potansiyel Hidrojen Derişimi

**PSGL-1 :** P-selektin Glikoprotein Ligand-1

**RC :** Retikülat Form

**rRNA :** Ribozomal Ribonükleik Asit

**TTP :** Timidin Trifosfat

# RESİMLER DİZİNİ

[**Resim 1.** *Anaplasma phagocytophilum* inklüzyonlarının metamiyelosit hücre ve miyelosit hücredeki sitoplazmik görüntüsü 7](#_Toc96608120)

[**Resim 2.** Plasmid DNA’sının EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonrası *Anaplasma phagocytophilum* nested PCR ürününün plasmid içerisinde varlığının gösterilmesi. 31](#_Toc96608121)

[**Resim 3.** İzmir-Urla’dan alınan at kanı örneklerinin *Anaplasma phagocytophilum* nested PCR reaksiyonu agaroz jel elektroforesis görüntüsü. 34](#_Toc96608122)

[**Resim 4.** Denizli ilinden alınan at kanı örneklerinin *Anaplasma phagocytophilum* nested PCR reaksiyonu agaroz jel elektroforesis görüntüsü 34](#_Toc96608123)

# TABLOLAR DİZİNİ

[**Tablo 1.** Ülkelere göre rapor edilen *Anaplasma phagocytophilum* vektörleri. 6](#_Toc96608226)

[**Tablo 2.** Avrupa'daki kenelerde *A. phagocytophilum* yaygınlığı 9](#_Toc96608227)

[**Tablo 3.** Avrupa'daki kenelerde *A. phagocytophilum* yaygınlığı 10](#_Toc96608228)

[**Tablo 4.** ABD'deki kenelerde *A. phagocytophilum* yaygınlığı 10](#_Toc96608229)

[**Tablo 5.** Batı Avrupa’da at granülositik anaplazmosis prevalans oranları 12](#_Toc96608230)

[**Tablo 6.** Doğu Avrupa’da at granülositik anaplazmosis prevalans oranları 13](#_Toc96608231)

[**Tablo 7.** Asya’da at granülositik anaplazmosis prevalans oranları 13](#_Toc96608232)

[**Tablo 8.** Amerika’da at granülositik anaplazmosis prevalans oranları 14](#_Toc96608233)

[**Tablo 9.** Afrika'da at granülositik anaplazmosis prevalans oranları 14](#_Toc96608234)

[**Tablo 10.** Türkiye'de at granülositik anaplazmosis prevalans oranları. 14](#_Toc96608235)

[**Tablo 11.** Atlara ait cinsiyet, yaş, ırk ve lokasyon bilgileri. 25](#_Toc96608236)

[**Tablo 12.** *Anaplasma phagocytophilum* türüne özgü primerlerin özellikleri 28](#_Toc96608237)

# ŞEKİLLER DİZİNİ

[**Şekil 1.**  *Anaplasma phagocytophilum* taksonomik durumu 4](#_Toc96608441)

[**Şekil 2.** Dünya genelinde 1990 ila 2018 yılları arasında at granülositik anaplazmozunu rapor eden ülkeler haritası 11](#_Toc96608442)

[**Şekil 3.** *Anaplasma phagocytophilum* birinci basamak nested PCR ürününün sekans analiz sonucu 32](#_Toc96608443)

[**Şekil 4.** *Anaplasma phagocytophilum* nested PCR ürününün ikinci basamak ürününün sekans analiz sonucu 33](#_Toc96608444)

# ÖZET

**EGE BÖLGESİNDEKİ ATLARDA *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Toker H. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji (Veteriner) Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2022.**

**Amaç:** Günümüzde değişen çevresel koşullar ve küresel iklim değişikliği ile beraber, ticari üretimin yaygınlaşmasına bağlı olarak tarımsal ve hayvansal üretimin sürekli gelişmesi sonucunda son yıllarda dünya genelinde *Anaplasma phagocytophilum* gibi vektör kaynaklı zoonotik hastalıkların giderek arttığı ve daha geniş alanlara yayıldığı gözlenmektedir. *A. phagocytophilum* nötrofilleri işgal eden ve morula adı verilen intravakuolar agregatlar oluşturan zorunlu bir hücre içi bakteridir ve *Ixodes* spp. tutmaları ile konaklarına bulaşmaktadır. *A. phagocytophilum* geniş bir konakçı yelpazesine sahiptir ve insanlar da dahil olmak üzere birçok memeli türünde ciddi hastalıklara neden olabilmektedir. Bununla birlikte, klinik semptomlar subklinikten ölümcül durumlara kadar değişmektedir, bu nedenle hem insan hem de veteriner hekimlikte *A. phagocytophilum*’dan kaynaklı klinik olayların önemli ölçüde eksik bildirildiği düşünülmektedir. *Anaplasma phagocytophilum* atlarda iştahsızlık, letarji, hemoraji ve topallıkla seyreden akut bir hastalığa neden olmaktadır. Bugüne kadar Türkiye’de *A. phagocytophilum’*unatlarda varlığı ile ilgili sadece iki çalışma bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında Ege Bölgesinde yetiştirilen atlarda *A. phagocytophilum*’un olup olmadığının nested PCR yöntemi kullanılarak tespit edilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, Aydın (n:69), Denizli (n:53) ve İzmir (n:64) illerinde yetiştirilen atlardan toplamda 186 adet kan örneği alınmış ve DNA izolasyonu sonrasında nested PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

**Bulgular:** Bu çalışma sırasında elde edilen hiçbir DNA örneğinde *A. phagocytophilum* varlığı tespit edilmemiştir.

**Sonuç:** Sonuç olarak, bu çalışma, Ege Bölgesi’nde örneklerin elde edildiği alanlarda, atların *A. phagocytophilum*’un epidemiyolojisinde önemli bir rol üstlenmediğini göstermiştir. Bununla birlikte, daha önce sığır ve köpekler üzerinde yapılan çalışmalar *A. phagocytophilum*’un Ege Bölgesi’nde yaygın olarak bulunduğunu ortaya koymuştur. Aynı bölgedeki atlarda *A. phagocytophilum*’un tespit edilememesinin bölgede var olan *A. phagocytophilum*’un antijenik yapısı, vektör kenelerin varlığı, örnekleme zamanı, kullanılan tanı tekniği gibi pek çok nedenden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bütün bu hipotezlerin değerlendirilebilmesi için *A. phagocytophilum*’un epidemiyolojisinde rol oynayan bütün etkenlerin bir arada incelendiği daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Anaplasma phagoctophilum*, Anaplasmosis, At, Nested PCR.

# ABSTRACT

**INVESTIGATION OF *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* PRESENCE OF HORSES IN AEGEAN REGION**

**Toker H. Aydin Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Parasitology (Veterinary) Program, Master’s Thesis, Aydin, 2022.**

**Objective:** It has been observed in recent years that vector-borne zoonotic diseases such as *Anaplasma phagocytophilum* have been increasing and spreading to larger areas throughout the world as a result of the continuous development of agricultural and animal production, expansion of commercial production, and altered environmental conditions along with global climate change. *A. phagocytophilum* is an obligate intracellular bacterium that invades neutrophils and forms intravacuolar aggregates referred to as morula. The parasite infects their hosts through *Ixodes* spp. ticks. *A. phagocytophilum* has a wide host range and can cause serious diseases in many mammalian species, including humans. As symptoms range from subclinical to fatal, clinical cases due to *A. phagocytophilum* infections are thought to be significantly underreported in both human and veterinary medicine. *A. phagocytophilum* causes an acute disease in horses with loss of appetite, lethargy, hemorrhage and lameness. To date, there are only two studies on the presence of *A. phagocytophilum* in horses in Turkey. The aim of the current thesis was to determine the presence of *A. phagocytophilum* in horses bred in the Aegean Region using nested PCR.

**Material and Methods:** In the present study, a total of 186 blood samples were taken from different horses bred in Aydın (n: 69), Denizli (n: 53) and İzmir (n: 64) provinces and nested PCR analyzes were performed after DNA isolation.

**Results:** *A. phagocytophilum* could not be detected in any of the DNA samples examined in the current study.

**Conclusions:** It appears that horses do not play an important role in the epidemiology of *A. phagocytophilum* in the above-mentioned provinces of the Aegean Region. This is in contrast to evidence gathered from previous studies performed on cattle and dogs indicating that the disease is relatively common in the Aegean Region. It is suggested that the inability to detect *A. phagocytophilum* in horses in the same region may be due to a range of factors including, but not limited to, the antigenic structure of *A. phagocytophilum* present in the region, the presence of vector ticks, time of sampling, and/or the diagnostic technique used. More comprehensive studies should be performed in order to evaluate whether or not, and to what extent, these factors play a role in the epidemiology of *A. phagocytophilum.*

**Keywords:** *Anaplasma phagoctophilum*, Anaplasmosis, Horse, nested PCR.

# GİRİŞ

Değişen üretim şekilleri ve insani ilişkiler ile birlikte iklim kuşaklarının bölgesel değişimine bağlı ortaya çıkan vektör kaynaklı hastalıkların yayılımı daha da kolaylaşmıştır. Bunun sonucunda değişik coğrafyalarda görülen zoonotik hastalıklar başka bölgelere de sıçrayarak diğer bölgelerdeki hayvan ve insan sağlığı için tehdit oluşturabilmektedir. Küresel ısınma sonucu artan sıcaklıklar, çeşitli hastalık etkenlerine vektörlük yapan kene, sinek ve diğer etkenlerin populasyon sayılarını ve yayılım alanlarını genişlemesine neden olmakta bu da vektör kaynaklı daha fazla zoonotik ve vektör kaynaklı hastalık vakalarının görülmesi ile sonuçlanmaktadır (Kara, 2012). Buna bağlı olarak vektör kaynaklı vakalar tropikal alandan subtropikal bölgelere doğru hatta arktik bölgelerin sınırlarına kadar geniş bir coğrafik alanda görülebilmektedir. Yani konakçının artışı daha fazla hastalık etkeni parazit canlının taşınmasını sağlamıştır. Bu durum ise hastalık vakalarının daha sık görülmesine neden olmuştur.

Vektör kaynaklı enfeksiyon hastalıklardan biri olan anaplasmosise, *Anaplasma* türleri neden olmaktadır. *A. marginale, A. centrale, A. bovis, A. ovis* ruminantlar, *A. platys* köpekler ve *A. phagocytophilum* insanlar, ruminantlar ve atlarda enfeksiyon hastalıklarına sebebiyet verdiği belirtilmektedir (İnci ve diğerleri, 2016). Bu türlerden biri olan *A. phagocytophilum*’unoluşturduğu enfeksiyon, insanlarda; insan granulositik anaplasmosis (human granulositik anaplasmosis - HGA), sığırlarda; mera humması (pasture fever), diğer hayvanlarda ise kene kaynaklı ateş (tick-borne fever - TBF) olarak isimlendirmektedir. Atlarda ise *A. phagocytophlium* enfeksiyonları, at granulositik anaplasmosis (equine granulocytic anaplasmosis - EGA) olarak adlandırılmaktadır (Alessandra ve Santo, 2012). *Anaplasma phagocytophilum* etkenin karakteristik olarak atları sonbaharın sonlarından ilkbaharın başlarına kadar etkilediği ve ağırlıklı olarak Lyme hastalığını da yayan *Ixodes* türü keneler yoluyla yayıldığı belirlenmiştir. Hastalık vakaları şimdiye kadar daha çok ABD, Avrupa ve İsrail'de bildirilmiştir (Roellig ve Fang, 2012). Türkiye’de ise genellikle atlar hariç, sığırlar, koyunlar, köpekler, fareler, insanlar arasında sirküle olduğuna dair birçok çalışma bulunmaktadır (Arslan, 2005; Karagenc ve diğerleri, 2005; Aktaş ve diğerleri, 2010; 2011; Hoşgör ve diğerleri, 2015). Ancak *A. phagocytophilum* Türkiye’deki atlardaki yaygınlığı ile ilgili bugüne kadar sadece iki çalışmaya rastlanmıştır. İlk defa Günaydın ve diğerleri (2018) tarafından serolojik olarak ortaya koyulurken, Oğuz (2021) hem serolojik hem de moleküler olarak *A.phagocytophilum*’uatlarda tespit etmiştir.Ancak günümüze kadar çok az sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle bu çalışma ile hem Ege Bölgesi’nde yetiştirilen atlar *A. phagocytophilum* açısından değerlendirilmiş hem de Türkiye’deki varlığı ile bilgi sahibi olunmasını katkı sağlanacaktır.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. *Anaplasma phagocytophilum*

### 2.1.1. Tarihsel Bakış

Ateş ile ilgili şikâyet sonucu akut bir hastalık olan kene kaynaklı ateşli hastalık vakası, ilk olarak 1932'de İskoç koyunlarının lökositlerinde tanımlanmıştır (Gordon ve diğerleri, 1932). Hastalığın patojeni *Ehrlichia phagocytophila* olarak adlandırılmıştır. Daha sonraki yıllarda diğer geviş getiren hayvanlardaki kene kaynaklı ateşin sorumlusu olarak nitelendirilmiş ve 1950'lerde İngiltere ve Finlandiya'daki sığırlarda mera ateşinin etkeni olarak nitelendirilmiştir (Hudson, 1950; Woldehiwet, 1983; Bjöersdorff, 2005).

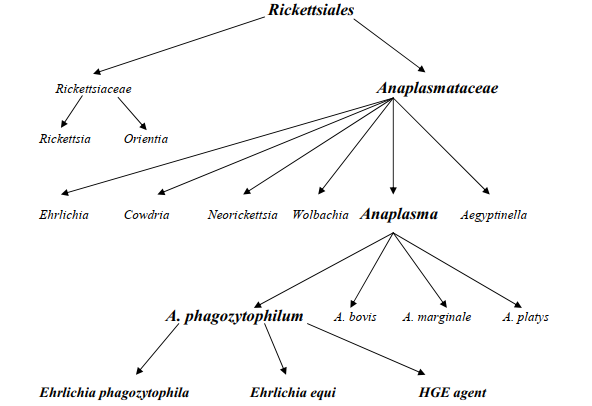
Atlarda ilk kez granülositik ehrlichiosis 1969'da Kuzey Kaliforniya'da tespit edilmiş olup patojen etkeni *Ehrlichia equi* olarak adlandırılmıştır (Gribble, 1969). Almanya'da ise atlarda granülositik ehrlichiosis ilk defa 1984 yılında saptanmıştır (Büscher ve diğerleri, 1984). Türkiye’de ise ilk defa Günaydın ve diğerleri (2018) tarafından serolojik olarak varlığı ortaya koyulmuştur.

Başlangıçta *E. equi* ve *E. phagocytophila* türleri ultra yapısal morfolojileri ve fenotipik ifadeleri nedeniyle ayrı türler olarak kabul edilmiştir (Greig ve Armstrong, 2006). Daha önceleri insan granülositik ehrlichiosis olarak bilinen insan granülositik anaplasmozu (HGA) ise ABD'de ilk defa 1994 yılında gözlemlenmiştir (Chen ve diğerleri, 1994). Bu zamana kadar, hastalığın sadece vahşi doğada yaşayan hayvanlarla sınırlı olduğu düşünülmekteydi (Woldehiwet, 2010). Bu durum patojenlerin daha fazla araştırılması gerektiği algısına sebebiyet vermiştir. Bu araştırmalar, bir yandan nötrofillerde çoğalma yeteneği, diğer yandan mera ateşi, at ateş şikâyetinin etkeni ile HGA'nın nedensel ajanı olması granülositik ehrlichiosis ile ilişkilendirilmesini sağlamıştır (Chen ve diğerleri, 1994; Greig ve diğerleri, 1996; Dumler ve diğerleri, 2001). Artan çalışmalar nihayetinde ve moleküler biyolojik çalışmalar ışığında, *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* ve HGA ajanı 16S rRNA geninin sekanslama sonuçlarına göre *A. phagocytophilum* adı altında gruplanması kararlaştırılmıştır (Dumler ve diğerleri, 2001).

Keşfedilmesinden bu yana, çok sayıda granülositik anaplasmosis vakası, özellikle ABD'de en yaygın ikinci kene kaynaklı hastalıklardan biri durumundadır (Bakken ve diğerleri, 1994; Madigan ve diğerleri, 1995; Magnarelli ve diğerleri, 1998). Aynı zamanda Avrupa'da ve Asya'da, önemli rahatsızlıklardan biri olan insan granülositik anaplasmozu (HGA) giderek daha yaygın hale gelmektedir (Parola ve Raoult, 2001). 1995'ten beri çeşitli Avrupa ülkelerinde insanlarda ve hayvanlarda granülositik anaplasmosis tespit edilmiştir (Engvall ve diğerleri, 1996).

### 2.1.2. Taksonomi ve Özellikleri

*Anaplasma phagocytophilum* taksonomik olarak *Rickettsiales* takımından *Anaplasmataceae* familyasına aittir (Dumler ve diğerleri, 2001). *A.phagocytophilum’*un köken haritası Şekil 1’de gösterilmiştir.Eski tür isimleri olan *E. phagocytophila* ve *E. equi;* HGA ajanı olarak hala güncelliğini korumakta ve *A. phagocytophilum*'un çeşitli suşlarının adlandırılmasında halen kullanılmaktadır (Greig ve Armstrong, 2006).



Şekil 1. *Anaplasma phagocytophilum* taksonomik durumu (Dumler ve diğerleri, 2001).

*Anaplasma phagocytophilum*, yaklaşık 0,4-1,3 μm boyutunda Gram negatif zorunlu hücre içi bakteridir. *A. phagocytophilum*, memelileri enfekte ederken nötrofillerde kolonize olur; bununla birlikte, miyeloid ve miyeloid kaynaklı olmayan diğer hücreleri de enfekte etmektedir (Rikihisa, 2010). Ixodid kenelerin içinde tükürük bezlerinde ve orta bağırsak hücrelerinde yaşadığı bilinmektedir (Severo ve diğerleri, 2012).

Elektron mikroskobu kullanılarak yapılan çalışmalarda iki farklı *A. phagocytophilum* morfotipi tanımlanmıştır. Bunlar ağsı yapıda (retikülosit) ve yoğun koyu çekirdekli (dence core) yapılardır. Deneyler, ağsı morfotipin *A. phagocytophilum*’un gelişim döngüsünün enfeksiyöz olmayan çoğalma formu olduğunu, yoğun çekirdek (DC) morfotipinin ise yoğun bir nükleoite sahip olduğunu, çevresel değişikliklere dirençli olduğunu ve memeli hücrelerini enfekte ettiğini göstermektedir (Severo ve diğerleri, 2012).

### 2.1.3. Konakçı ve Vektörler

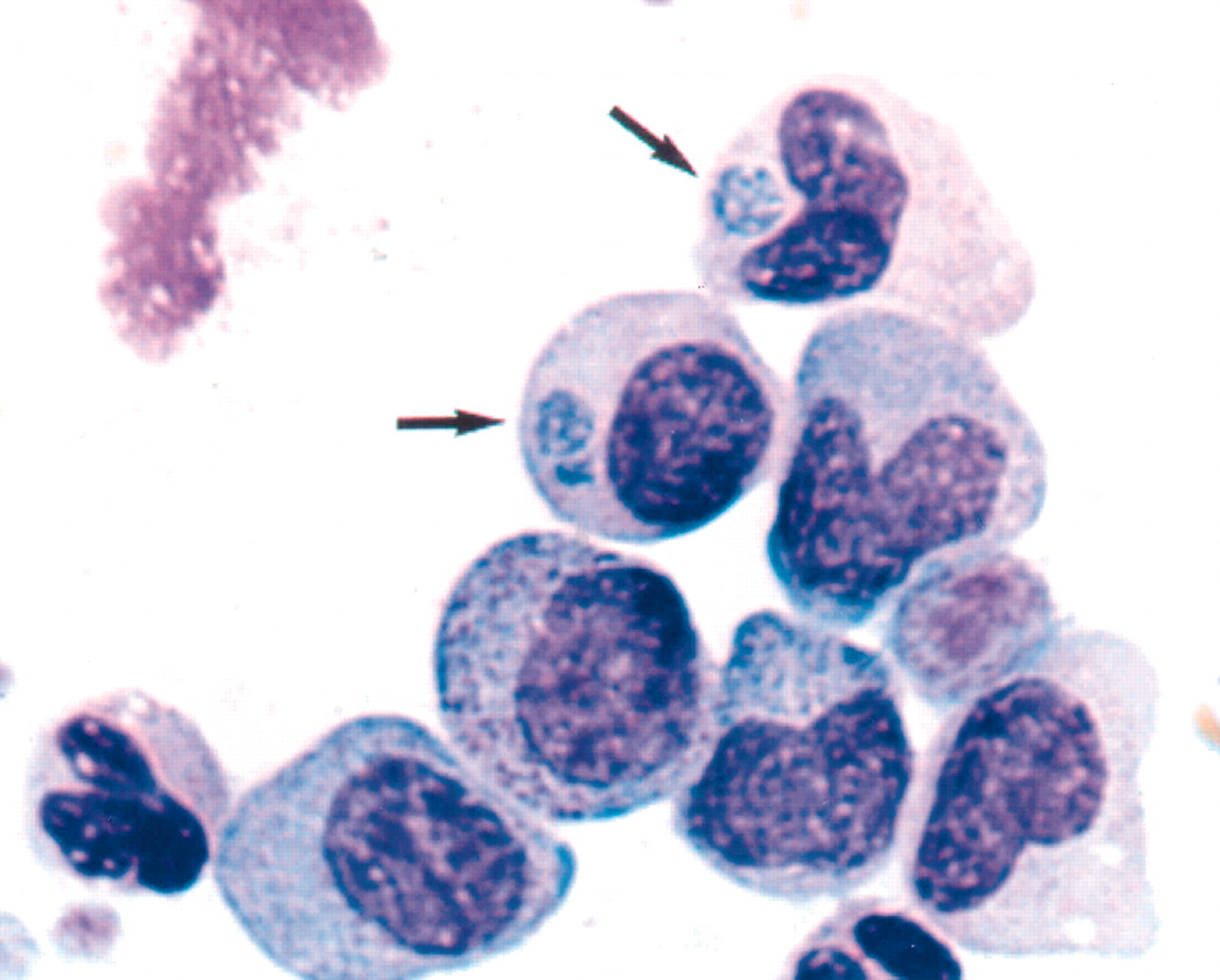
*Anaplasma phagocytophilum*’un konakçıları çok sayıda evcil ya da vahşi hayvan ve insanlardır. Genellikle etkilenen evcil ve çiftlik hayvanları olan atlar, köpekler, kediler, koyunlar, sığırlar, bizonlar ve lamalardır. Deneysel bir çalışmada kobay olarak seçilen primatlar ve farelerde de enfeksiyona neden olmuşlardır (Neer, 1998; Bjöersdorff ve diğerleri, 1999). *A. phagocytophilum* patojen rezervuarı vahşi hayvanlar olarak nitelendirilmektedir. Avrupa'da kızıl geyik (*Cervus elaphus*), karaca (*Capreolus capreolus*), geyik (*Rupicapra rupicapra*), kızıl tilkiler (*Vulpes vulpes*) ve küçük kemirgenler (Alberdi ve diğerleri, 2000; Liz ve diğerleri, 2000; Petrovec ve diğerleri, 2002) ABD'de ise beyaz ayaklı geyik faresi (*Peromyscus leucopus*) ve beyaz kuyruklu geyikler (*Odocoileus virginianus*) ana rezervuar türlerdir (Telford ve diğerleri, 1996; Kim ve diğerleri, 2002; Munderloh ve diğerleri, 2003). Munderloh ve diğerleri (2003) tarafından yapılan çalışmada *Ixodes scapularis* kene hücre kültürü kullanılarak, ak kuyruklu geyiklerin (*Odocoileus virginianus*) kanında *Anaplasma* spp. izole edilmiş ve bu enfekte kene hücre kültürü ile bir geyik başarıyla enfekte edilmiştir. Avrupa'da *Ixodes ricinus* ve ABD'de *I. scapularis* ve *I. pacificus*, *A. phagocytophilum* için ana vektörlerdir. Asya'da ise *I. persulcatus* ana vektör niteliğindedir (Parola ve Raoult, 2001). Ancak yapılan çalışmalarda *Ixodes* spp. dışında *Dermacentor* spp., *Haemaphysalis* spp*.* ve *Rhipicephalus* spp. gibi pek çok kenede *A. phagocytophilum’*unvarlığı bildirilmiştir (Tablo 1)*.* Bu türlerin *A. phagocytophilum* için vektörleri olup olmadığının belirlenmesi içindaha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

**Tablo 1.** Ülkelere göre rapor edilen *Anaplasma phagocytophilum* vektörleri.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Ülke** | **Vektörler** | **Referans** |
| Çin | *Ixodes persulcatus, Dermacentor silvarum, Haemaphysalis concinna ve Haemaphysalis longicornis.* | Cao ve diğerleri, 2006; Jiang ve diğerleri, 2011 |
| Japonya | *Ixodes persulcatus, I. ovatus ve Haemaphysalis megaspinos* | Ozawa ve diğerleri,2009; Ybanez ve diğerleri, 2012; Ybanez ve diğerleri, 2013; |
| Kore | *Ixodes nipponensis ve Haemaphysalis longicornis* | Chae ve diğerleri, 2008 |
| Avrupa | *Ixodes ricinus* | Butler ve diğerleri, 2005; Woldehiwet, 2010 |
| İngiltere/Avrupa | *Ixodes trianguliceps* | Bown ve diğerleri, 2009; Blanavora ve diğerleri, 2014; |
| Fransa | *Rhipicephalus spp*., *R. pusillus, Dermacentor marginatus, H. marginatum ve* Haemaphysalis *punctata, Ixodes ricinus* | Chastagner ve diğerleri, 2013; Dugat ve diğerleri, 2014 |
| İtalya | *Rhipicephalus bursa,* R. turanicus, D. marginatus, I. ricinus, H. marginatum ve Hae. punctata | Torina, 2008 |
| İspanya | *Ixodes frontalis, I. ricinus, Hae. punctata, Hyalomma marginatum* | Palomar ve diğerleri, 2015 |
| Letonya/Estonya | *Ixodes persulcatus* | Santos ve diğerleri, 2004; Atıf, 2015; Rar ve diğerleri, 2011 |
| Rusya/Sırbistan | *Dermacentor reticulate ve Haemaphysalis concinna* | Masuzawa ve diğerleri, 2008; Tomanovic ve diğerleri, 2013 |
| ABD | *Ixodes pacificus, I. capularis, I. spinipalpis* | Rejmanek ve diğerleri, 2011; Roellig ve Fang, 2012; Dugat ve diğerleri, 2015 |
| Rusya | *Ixodes persulcatus* | Alekseev ve diğerleri, 2001; Rar ve diğerleri, 2011; Dugat ve diğerleri, 2015 |
| Türkiye | *Ixodes ricinus* | Christova ve diğerleri, 2003 |
| Cezayir/Tunus/Fas | *Ixodes ricinus ve H. marginatum* | Sarih ve diğerleri, 2005; M’ghirbi ve diğerleri, 2012 |

### 2.1.4. Gelişim Döngüsü ve Bulaşma

Temelde *Anaplasma phagocytophilum*’un yaşam döngüsü omurgalıları ve keneleri içermektedir. Bu nedenle döngüsel yaşamını, memeliler ve keneler arasında sürdürmektedir (Rikihisa, 2011). Zoonotik potansiyele sahip patojen olan *A. phagocytophilum* (Madigan ve diğerleri, 1995) için yabani hayvanlar doğal bir rezervuar olarak görülmektedir (Polin ve diğerleri, 2004). Patojenler konak hayvanlara bulaşması kenenin kan emmesi sırasında tükrük yoluyla gerçekleşmekte ve konağın lökositlerine yerleşim göstermektedir (Resim 1) (Neer, 1998; Ogden ve diğerleri, 2003).



Resim 1. *Anaplasma phagocytophilum* inklüzyonlarının metamiyelosit hücre ve miyelosit hücredeki sitoplazmik görüntüsü (Oklar morulaları göstermektedir) (Bayard-Mc Neeley ve diğerleri, 2004).

Tükürükle bulaşan *A. phagocytophilum*’unkonakçı hücrelere yapışmasında P-selektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1) reseptörü olarak işlev gören yüzey proteini (msp2), belirleyici bir rol oynamaktadır (Goodman ve diğerleri, 1999; Herron ve diğerleri, 2000; Park ve diğerleri, 2003). Enfeksiyöz temel partiküller hücreye girdikten sonra, ikiye bölünerek çoğalmakta ve gelişimini konakçı hücrelerde sağlamaktadırlar. Başlangıçta 1 ila 1,5 µm kadardır. Birkaç gün içerinde morula (1,5 ila 6 µm) oluşumu gözlemlenmektedir. Bir konakçı hücrede birkaç morula mevcut olabilmektedir (Von Loewenich ve Bogdan, 2001). Enfeksiyöz organizmalar esas olarak nötrofillerde ve eozinofillerde yer almakta, monositler ve lenfositler ise *A. phagocytophilum* için ikincil konak hücreleridir (Streit, 1993). Patojen sadece kenelerden memelilere bulaşır ve transtadialdır (Telford ve diğerleri, 1996). Kenelerdeki gelişme ise henüz detaylı olarak araştırılmamıştır. *Anaplasmataceae* familyasına ait olması nedeniyle, kenelerde gelişme, üreme, yayılma ve memelilere bulaşma *Ehrlichia canis'*e benzer şekilde olduğu sanılmaktadır (Stich, 2008; [Ismail](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ismail%20N%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=20513551) ve diğerleri, 2010; Andre, 2018).

### 2.1.5. Epidemiyolojisi

İnsanlarda ve hayvanlarda hastalığın coğrafi dağılımı ve mevsimselliği vektörlerin dağılımına bağlıdır. Bu dağılımı bulmak için vektör olan kene türlerine bakmak gereklidir (Greig ve Armstrong, 2006). Artan mevsimsel değişim ve küresel ısınmanın etkisiyle *A. phagocytophilum* dünya çapında yayılımının artacağı tahmin edilmektedir. Nitekim vektörlerine bakıldığında *A. phagocytophilum* Kuzey Afrika’dan Amerika’ya, Avrupa’dan Asya’ya kadar geniş bir coğrafik yaygınlığa sahip olduğu görülmektedir (Tablo 2).

Granülositik anaplasmosisin yaygınlığını belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalarda *Ixodes scapularis* veya *I. ricinus* kenelerinde *A. phagocytophilum*’un varlığı yaygın olarak tespit edilmiştir. Avrupa'da (von Stedingk ve diğerleri, 1997; Pusterla ve diğerleri, 1998; Baumgarten ve diğerleri, 1999; Fingerle ve diğerleri, 1999; Schouls ve diğerleri, 1999; Christova ve diğerleri, 2001; Polin ve diğerleri, 2004) ve ABD'de (Courtney ve diğerleri, 2003). *I. persulcatus* türü kenede *A. phagocytophilum* ilk kez Çin'de daha sonra Rusya coğrafyasında tespit edilmiştir (Cao ve diğerleri, 2003; Masuzawa ve diğerleri, 2008; Tomanovic ve diğerleri, 2013). *A. phagocytophilum*’un varlığı Avrupa'da (Stanek, 2005), Amerika’da (Greig ve diğerleri, 1996), Asya’da (Suksawat ve diğerleri, 2001), Afrika’da (Sarih ve diğerleri, 2005) diğer çalışmalarla da tespit edilmiştir. Nitekim bu geniş coğrafik yaygınlık kenelerin yayılımıyla paraleldir. Çünkü potansiyel konakçı ve rezervuar hayvanların durumu *A. phagocytophilum*'ungörülmesini etkileyen en büyük faktörlerden biridir (Fingerle ve diğerleri, 1999). Avrupa’daki kenelerdeki *A. phagocytophilum* yaygınlığı, incelenen kene sayıları ve referansları Tablo 2’de listelenmiştir. ABD’deki kenelerdeki *A. phagocytophilum* yaygınlığı, incelenen kene sayıları ve referansları ise Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 2. Avrupa'daki kenelerde *A. phagocytophilum* yaygınlığı (Galke, 2009)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Ülke** | **Yaygınlık (%)** | **İncelenen Kene Sayısı** | **Çalışmanın Yazarı ve Tarihi** |
| Bulgaristan | 19,8 | 202 | Christova ve diğerleri, 2001 |
| Danimarka | 23,6 | 106 | Skarphedinsson ve diğerleri, 2007 |
| Almanya | 2,2 | 287 | Baumgarten ve diğerleri, 1999 |
| 1,6 | 492 | Fingerle ve diğerleri, 1999 |
| 2,3 | 305 | Hildebrandt ve diğerleri, 2003 |
| 4,1 | 1022 | Von Loewenich ve diğerleri, 2003 |
| 1,9 | 5424 | Hartelt ve diğerleri, 2004 |
| 4,5 | 625 | Leonhard, 2005 |
| 3,9 | 127 | Pichon ve diğerleri, 2006 |
| 2,9 | 2862 | Silaghi ve diğerleri, 2008 |
| Estonya | 3 | 100 | Mäkinen ve diğerleri, 2003 |
| Finlandiya | 0 | 343 | Mäkinen ve diğerleri, 2003 |
| Fransa | 0,4 (larva),1,2 (yetişkin) | 1065 (larva),171 (yetişkin) | Ferquel ve diğerleri, 2006 |
| 0,1 | 1049 | Beytout ve diğerleri, 2007 |
| İtalya | 8 | 141 | Santino ve diğerleri, 2003 |
| 9,84 | 1212 | Rizzoli ve diğerleri, 2004 |
| 0 | 88 | De La Fuente ve diğerleri, 2005 |
| 4,4 | 1931 | Piccolin ve diğerleri, 2006 |
| Norveç | 2,1 | 341 | Jenkins ve diğerleri, 2001 |
| Avusturya | 8,7 | 880 | Polin ve diğerleri, 2004 |
| Polonya | 19,2 | 424 | Stanczak ve diğerleri, 2002 |
| 4,5 | 533 | Skotarczak ve diğerleri, 2003 |
| 8,7 | 559 | Grzeszczuk ve diğerleri, 2004 |
| 14 | 701 | Stanczak ve diğerleri, 2004 |
| 13,1 | 694 | Tomasiewicz ve diğerleri, 2004 |
| 4,1 | 73 | Skotarczak ve diğerleri, 2006 |
| 14,1 | 1474 | Stanczak ve Grzeszczuk, 2006 |
| 14,5 | 372 | Grzeszczuk, 2006 |
| 10,2 | 684 | Chmielewska-badora ve diğerleri, 2007 |

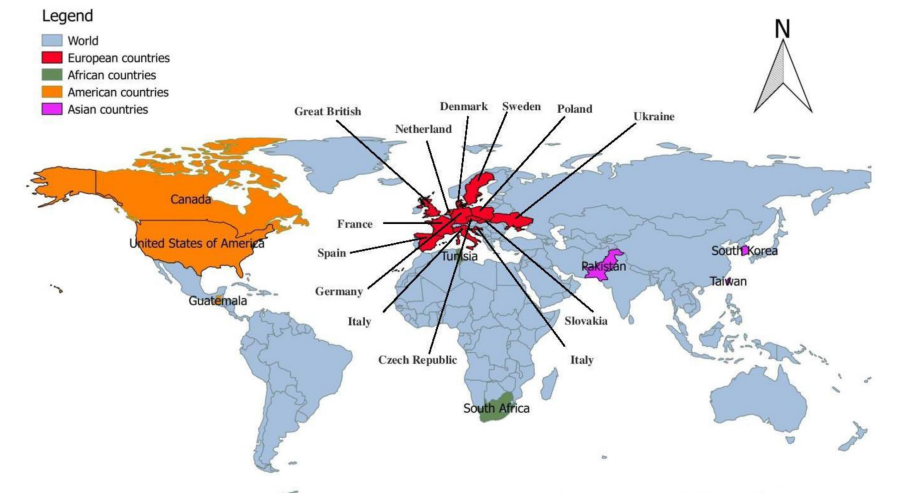
Tablo 3. Avrupa'daki kenelerde *A. phagocytophilum* yaygınlığı (Galke, 2009) (Devam)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Ülke** | **Yaygınlık (%)** | **İncelenen Kene Sayısı** | **Çalışmanın Yazarı ve Tarihi** |
| Portekiz | 4 (I. ricinus)2 (I. ventalloi)2 (I. ricinus) | 142 larva93 larva93 larva | Santos ve diğerleri, 2004 |
| İskoçya | 1,4 (larva)1,6 (dişi)2,1 (eril) | 554 | Alberdi ve diğerleri, 1998 |
| İsveçre | 0,8 | 653 | Pusterla ve diğerleri, 1998 |
| 2 | 100 | Leutenegger ve diğerleri, 1999 |
| 1,3 | 1667 | Pusterla ve diğerleri, 1999 |
| 1,4 | 417 | Liz ve diğerleri, 2000 |
| Slovenya | 3,2 | 93 | Petrovec ve diğerleri, 1999 |
| İspanya | 5 | 74 | Oteo ve diğerleri, 2001 |
| Macaristan | 452 | 6,6 | Sréter ve diğerleri, 2004 |

Tablo 4. ABD'deki kenelerde *A. phagocytophilum* yaygınlığı (Galke, 2009)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Ülke** | **Yaygınlık (%)** | **İncelenen Kene Sayısı** | **Çalışmanın Yazarı ve Tarihi** |
| Kaliforniya | 0,8 | 1112 | Barlough ve diğerleri, 1997 |
| 2,0 (minimum enfeksiyon oranı) | 401 | Kramer ve diğerleri, 1999 |
| 6,19 (I. scapularis) 8,62 (D. variabilis) 1,03 (D. occidentalis) | 776 58 353 | Holden ve diğerleri, 2003 |
| 0,8 (enfekte kenelerin asgari yüzdesi) | 1112 | Barlough ve diğerleri, 1997 |
| Minesota | 3,8 | 103 | Layfıeld ve Guilfoile, 2002 |
| New Jersey | 17 | 100 | Varde ve diğerleri, 1998 |
| 1,9 | 107 | Adelson ve diğerleri, 2004 |
| 6,1 | 147 | Schulze ve diğerleri, 2005 |
| New York | 13,0 ± 3,2 | 1268 | Daniels ve diğerleri, 1998 |
| Güney Kaliforniya, Florida, Georgia | 1,6 | 818 | Fang ve diğerleri, 2002 |

Kenelerden kaynaklı olarak atlarda *A. phagocytophilum* varlığı üzerine birçok çalışma mevcuttur. Bazı ülkelerde vektörel kene türleri bulunsa da atlarda varlığı tespit edilememiştir. Bazı ülkelerde ise hem atlarda hem de vektör kenelerde *A. phagocytophilum* varlığı tespit edilmiştir. Saleem ve diğerleri (2018) tarafından hazırlanan dünya genelinde at granülositik anaplasmosis prevelansını rapor eden ülkeler dünya haritası üzerinde Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Dünya genelinde 1990 ila 2018 yılları arasında at granülositik anaplazmozunu rapor eden ülkeler haritası (Saleem ve diğerleri, 2018).

Atlarda *A. phagocytophilum* varlığı üzerine yapılan çalışmalar, çalışmanın yapıldığı ülkeler ve prevelansları Tablo 4, Tablo 5, Tablo 6, Tablo 7, Tablo 8 ve Tablo 9’da ayrı ayrı sunulmuştur.

**Tablo 5.** Batı Avrupa’da at granülositik anaplazmosis prevalans oranları (Saleem ve diğerleri, 2018).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ülke** | **Çalışmanın Yılı** | **Diagnostik Methodu** | **Tür** | **Prevalans (%)** | **Referans** |
| **Batı Avrupa** | | | | | |
| İsveç | 1990 | Mikroskopi | At | - | Bjöersdorff ve diğerleri, 1990 |
| Büyük Britanya | 1994 | IFAT | At |  | Korbutiak ve diğerleri, 1994 |
| İsveç | 1995 | Mikroskopi ve  PCR | At |  | Johansson ve diğerleri, 1995 |
|  | 1996 | Mikroskopi ve  PCR | At | 69.2 | Engvall ve diğerleri, 1996 |
| Danimarka | 1997 | Mikroskopi ve  PCR | At |  | Eriksen ve diğerleri, 1997 |
|  | 2000 | Mikroskopi ve  PCR | At |  | Madigan ve Pusterla, 2000 |
|  | 2010 | SNAP\* 4Dx\*  ELISA | At | 22.3 | Hansen ve diğerleri, 2010 |
| Fransa | 2005 | ELISA | At | 11.3 | Leblond ve diğerleri, 2005 |
| İtalya | 2003 | Mikroskopi ve  IFAT | At | 0.3 | Scarpulla ve diğerleri, 2003 |
|  | 2008 | IFAT | At | 16.89 | Ebani ve diğerleri, 2008 |
|  | 2008 | IFAT,  PCR | At  Eşek  At  Eşek | 7.79  18.91  00.00  3.94 | Torina ve diğerleri, 2008 |
|  | 2010 | IFAT,  nested PCR | At | 17.03  8.14 | Passamonti ve diğerleri, 2010 |
|  | 2013 | Mikroskopi PCR | At | 3.12  12.5 | Dziegiel ve diğerleri, 2013 |
| Almanya | 2013 | Mikroskopi PCR | At | 16.67  16.67 | Dziegiel ve diğerleri, 2013 |
| İspanya | 2013 | Mikroskopi PCR | At | 7.55  18.87 | Dziegiel ve diğerleri, 2013 |
| Hollanda | 2008 | Mikroskopi ve PCR-RLB | At | - | Butler ve diğerleri, 2008 |
| Fransa | 2009 | ELISA  Dot-Blot | At | 18.02 | Maurizi ve diğerleri, 2009 |

Tablo 6. Doğu Avrupa’da at granülositik anaplazmosis prevalans oranları (Saleem ve diğerleri, 2018).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ülke** | **Çalışmanın Yılı** | **Diagnostik Methodu** | **Tür** | **Prevalans (%)** | **Referans** |
| **Doğu Avrupa** | | | | | |
| Polonya | 2009 | PCR | At | - | Adaszek ve diğerleri, 2009 |
|  | 2011 | PCR | At | - | Adaszek ve diğerleri, 2011 |
|  | 2013 | Mikroskopi PCR | At | 8.33  16.67 | Dziegiel ve diğerleri, 2013 |
|  | 2016 | nPCR | At | 2.63 | Slivinska ve diğerleri, 2016 |
| Çek Cumhuriyeti | 2011 | IFAT | At | 73 | Praskova ve diğerleri, 2011 |
| Ukrayna | 2013 | Mikroskopi  PCR | At | 00.00  10.00 | Dziegiel ve diğerleri, 2013 |
| Slovakya | 2016 | nPCR | At | 2.56 | Slivinska ve diğerleri, 2016 |
| Hırvatistan | 2017 | PCR | - | - | Gotić ve diğerleri, 2017 |

Tablo 7. Asya’da at granülositik anaplazmosis prevalans oranları (Saleem ve diğerleri, 2018).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ülke** | **Çalışmanın Yılı** | **Diagnostik Methodu** | **Tür** | **Prevalans (%)** | **Referans** |
| **Asya** | | | | | |
| Kore | 2003 | Nested PCR | At | - | Kim ve diğerleri, 2003 |
|  | 2017 | IFAT | At | - | Lee ve diğerleri, 2017 |
| Pakistan | 2015 | PCR-RFLP | At | 4.28 | Razzaq ve diğerleri, 2015 |
|  | 2014 | Mikroskopi | At  Eşek  Katır | 20.48  21.05  13.04 | Javed ve diğerleri, 2014 |
|  | 2017 | PCR | At  Eşek  Katır | 11.86  9.43  10.53 | Saleem ve diğerleri, 2018 |
| Tayvan | 2010 | C-ELISA ve ELISA | At | 2.05 | Chan ve diğerleri, 2010 |

Tablo 8. Amerika’da at granülositik anaplazmosis prevalans oranları (Saleem ve diğerleri, 2018).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ülke** | **Çalışmanın Yılı** | **Diagnostik Methodu** | **Tür** | **Prevalans (%)** | **Referans** |
| **Amerika** | | | | | |
| Kaliforniya | 1969 | Mikroskopi |  |  | Stannard ve diğerleri, 1969 |
| Kuzey Kaliforniya | 1990 | IFAT | At | 10.4 | Madigan, 1990 |
| Wisconsin | 1999 | Nested PCR | At | - | Plier ve diğerleri, 1999 |
| Guetemala | 2005 | PCR IFAT | At | 27.6  13 | Teglas ve diğerleri, 2005 |
| Kanada | 2015 | SNAP\* 4Dx\*  ELISA ve IFAT | At | 0.53 | Schvartz ve diğerleri, 2015 |

Tablo 9. Afrika'da at granülositik anaplazmosis prevalans oranları (Saleem ve diğerleri, 2018).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ülke** | **Çalışmanın Yılı** | **Diagnostik Methodu** | **Tür** | **Prevalans (%)** | **Referans** |
| **Afrika** | | | | | |
| Saharaaltı Afrikası | 2009 | ELISA  Dot-Blot | At | - | Maurizi ve diğerleri, 2009 |
| Afrika | 2012 | IFAT Nested  PCR | At | 67  13 | M’ghirbi ve diğerleri, 2012 |
| Tunus | 2014 | IFAT | At | 16.3 | Said ve diğerleri, 2014 |

Tablo 10. Türkiye'de at granülositik anaplazmosis prevalans oranları.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ülke** | **Çalışmanın Yılı** | **Diagnostik Methodu** | **Tür** | **Prevalans (%)** | **Referans** |
| **Türkiye** | 2018 | Serolojik | At | 8,57 | Günaydın ve diğerleri, 2018 |
|  | 2021 | PCR | At | 8.6 | Oğuz, 2021 |

### 2.1.6. Patojen Mekanizması

*Anaplasma phagocytophilum*, nötrofilik granülositlere nüfuz edip, normal fagositik mekanizmayı inhibe ederek granülositlerde çoğalımını gerçekleştirmektedir. *Anaplasma phagocytophilum* hücrelerinin konakçı hedef hücrelerine sokulduğu spesifik reseptör, nötrofilik granülositlerin yüzeyindeki selektif ligand olan PSGL-1'dir (P-selektin glikoprotein ligandı) (Herron ve diğerleri, 2000). Bu reseptör, NH2 terminaline veya PSGL-1 reseptörünün tirozin sülfat motifine karşı monoklonal antikorlarla bloke ederek, bakterinin artık *A. phagocytophilum* hücrelerine saldırmasını engellemektedir. Bu reseptörün yardımıyla endositoz meydana gelir ve patojen konakçı hücreye alınmaktadır. Nötrofil granülositlerine nüfuz ettikten sonra, *A. phagocytophilum*, ne erken ne de geç endozoma karşılık gelen bir inklüzyon gövdesinde (endozom) bulunur. Konakçıdaki gelişen hücreler, kendisini çevreleyen sitoplazmik vakuollerin hem bakterileri öldürmesi amaçlanan lizozomlarla hem de Golgi aparatının vezikülleri ile birlikte füzyonunu önlemektedir (Mott ve diğerleri, 2000; Webster ve diğerleri, 1998). Bununla birlikte, kesin mekanizma hala bilinmemektedir.

Fare üzerine yapılan bir çalışmada, etkilenen granülositlerdeki patojenin, NADPH oksidazın ana bileşenlerinden biri olan gp91phox'un seçici olarak inhibe ederek oksijen radikallerinin üretimini yavaşlattığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, *A. phagocytophilum* ile enfekte olan HGA hastalarının nötrofillerinde de aynı durum gözlemlenmiş ve herhangi bir oksijen radikali üretilmediği tespit edilmiştir (Wang ve diğerleri, 2002). *A. phagocytophilum*, enfekte nötrofillerin apoptozunun düzenlemesine birkaç şekilde müdahale etmektedir. Birincisi, bakteri anti-apoptotik bir etkiyi tetikler ve yeterli sayıda çoğalmak için konakçının ömrünü uzatır. Yoshiie ve diğerleri (2000) yaptıkları çalışmada, morfolojik apoptozda ve granülositlerde histonla ilişkili DNA parçalarının ortaya çıkmasında önemli bir gecikme gerçekleştiğini tespit etmiştir. Bununla birlikte Bender ve diğerleri (1998) tarafından yapılan çalışmada *A. phagocytophilum* ile enfekte HL-60 hücrelerinde gelişen apoptoz karakteristiğine sahip çok sayıda DNA ipliğinin kırıldığını keşfetmiştir. Ek olarak, apoptoza karşı koruma sağlayan Bcl-2 proteininin üretimi azaltılmış ve etkilenen hücrede giderek artan bakteri sayısı ile bağlantılı olarak, sonunda apoptoz indüklenmektedir.

Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmada enfekte koyunlardan gelen nötrofil inklüzyonları içindeki farklı *A. phagocytophilum* morfotipleri tanımlanmıştır (Woldehiwet, 2010). Hem memeli hem de kene hücre kültürlerinde iki morfotip bakteri de gözlemlenebilmektedir. Bunlardan büyük olanı retikülosit formuna (RC), yoğunlaştırılmış protoplazma (Munderloh ve diğerleri, 1996; Popov ve diğerleri, 2007) içeren daha küçük olan ise yoğun çekirdek formuna (DC) sahiptir. Bu formların hücre içi bakterilere benzer normal gelişim aşamaları gösterdiği ve ek olarak çeşitli anormal bakteri formları bulunduğu belirtilmektedir (Munderloh ve diğerleri, 1996; Popov ve diğerleri, 2007; Troese ve Carlyon, 2009). Bu anormal formların biyolojik önemi bilinmemektedir ancak bakterilerin olumsuz veya dengesiz bir fizyolojik durumunu yansıtıyor olabileceği düşünülmektedir.

Elektron mikroskobu, yalnızca DC formunun HL-60 hücrelerine bağlandığını (Troese ve Carlyon, 2009), ancak hem DC hem de RC formlarının ISE6 kene hücrelerine bağlandığını ve infekte olacak hücreye girdiğini göstermiştir (Munderloh ve diğerleri, 1996). Sadece DC formu, P-selektin glikoprotein ligandı 1'i (PSGL-1) ifade etmek üzere transfekte edilen hücrelerine bağlanır ve bağlanma, hücrelerin bir anti-PSGL-1 antikorunun ön inkübasyonu ile inhibe edilmektedir (Troese ve Carlyon, 2009). Troese ve Carlyon (2009) tarafından yapılan çalışmada içselleştirilmiş DC bakterilerinin 12 saat içinde HL-60 hücrelerinde RC bakterilerine geçiş yaptığını ve RC bakterilerinin çoğalmaya başladığını bildirmişlerdir. 24 saate kadar, bireysel inklüzyonlar içinde çok sayıda RC bakteri gözlemlenebilir ve 36 saate kadar, aynı hücre içinde bireysel, vakuol ile inklüze DC ve RC bakterileri ile zaten enfekte olmuş hücrelerin yeniden enfeksiyonu meydana gelmektedir. DC ve RC formlarının gelişim döngüsü, morfolojik olarak *Chlamydia* türlerine benzer şekilde gelişse de, *Chlamydia*'da (Hackstadt ve diğerleri, 1991) kromatin yoğunlaşmasında rol oynayan histon (H1) benzeri proteinleri kodlayan genler *A. phagocytophilum'*da tanımlanmamıştır.

### 2.1.7. Klinik Semptomlar ve Laboratuvar Bulguları

Anaplasmosise uğramış insan granülositlerinin kuluçka dönemi 7 ila 10 gün olarak değişmektedir. Semptomlar genellikle yüksek ateş, baş ağrısı ile birlikte akut ateşli, grip benzeri bir enfeksiyon şeklinde başlamaktadır. Kas ve eklem ağrısı ve zayıflığı ve genel halsizlik görülmektedir. Belirtileri gastrointestinal sistem, solunum yolu veya merkezi sinir sistemi rahatsızlıkları şeklinde hissedilmekte ve gelişim zamanının %50'sinden daha azında ortaya çıkmaktadır (Bakken ve Dummler, 2006). Klinik görünümleri Avrupa ve Kuzey Amerika'dakine benzerdir. Klinik hastalık vakalarının ölüm oranı yaklaşık %0,5 ile gerçekleşmektedir. Ölüm oranları düşük olsa da klinik semptomlar bazen zorlu geçmektedir. Bu yüzden insanlardaki vakalarda hastaların yaklaşık yarısı hastaneye kaldırılmaktadır.

Atlardan insanlara bulaşma riski şu anda belirsiz durumdadır. Atlar ve insanlar aynı ajanın suşları ile enfekte görünse de, insanların enfeksiyonu doğrudan enfekte atlardan değil, kene ısırıklarından aldıkları düşünülmektedir (Madigan ve diğerleri, 2021).

Atlarda belirtilerin şiddeti, hayvanın yaşına ve hastalığın süresine göre değişmektedir. Semptomlar hafif görülebilir. Bir yaşından küçük atların yalnızca ateşi olabilir; 1 ila 3 yaşındaki atlarda ateş, depresyon, hafif uzuvlarda şişme ve koordinasyon eksikliği gelişmektedir (Madigan, 1993). Yetişkinler, ateş, iştahsızlık, depresyon, hareket etmekte isteksizlik, uzuvlarda şişme ve sarılık gibi karakteristik belirtiler sergilemektedir (Reed ve diğerleri, 2004). Ateş, enfeksiyonun ilk 1 ila 3 gününde en yüksektir, ancak 6 ila 12 gün sürebilmektedir. Hatta şikayetler birkaç gün içinde daha şiddetli hale gelebilmektedir. Mevcut herhangi bir enfeksiyon (bacak yarası veya solunum yolu enfeksiyonu gibi) daha da kötüleşmektedir. Enfeksiyöz ajan, enfeksiyondan 3-5 gün sonra beyaz kan hücrelerinde bulunabildiğinden DNA ve antikor testleri de hastalığın tespitinde kullanılmaktadır (Davies ve diğerleri, 2011; Madigan, 2021).

Genellikle hastalık erken evrelerde uygun antibiyotikler kullanılarak kolaylıkla tedavi edilebilmektedir. Hastalığın şiddeti değişkenlik göstermekte; birçok at tedavi olmaksızın 14 gün sonra iyileşmektedir. Bununla birlikte, ikincil enfeksiyonlarla ilişkili olduğuna inanılan nadir ölümler meydana gelmiştir. Şiddetli belirtileri ve nörolojik belirtileri olan atlar, enjekte edilebilir kortikosteroidlerden fayda görebilmektedir. Kurtarılan atlar en az 2 yıl boyunca bağışıklık kazanmaktadır ve taşıyıcı değillerdir. Hastalığın kontrolü için kene kontrol önlemleri zorunlu olmakla birlikte, hastalıkla ilgili aşı mevcut değildir (Franzen ve diğerleri. 2005).

### 2.1.8. Tanı ve Tedavi

*Anaplasma phagocytophilum* enfeksiyonunu teşhis etmek için en uygun olanı; hücre içi morulaları Wright veya Giemsa ile boyanmış kan yaymalarında granülositlerde görselleştirilerek gerçekleştirmek ve bir EDTA tüpte alınan kandan *A.* *phagocytophilum*’aözgü PCR ile DNA dizilimlerini karşılaştırmaktır. Buna karşılık, akut teşhis için, dolaylı yollarla antikorların tespiti IDEXX'in immünofloresan antikor testleri (IFAT) veya SNAP4Ds testi daha az uygundur, tek bir serum numunesi, neredeyse hiç akut enfeksiyon titresi olmadığını gösterir ve ayırt edilmeyi sağlamaktadır (Veronesi ve diğerleri, 2014). Bununla birlikte, seroloji, akut ve nekahat serumu arasındaki titre hareketinin saptanmasına dayalı olarak geriye dönük bir tanıya izin verir (Aguero-Rosenfeld, 2002; Allison ve Little, 2013).

Nötrofillerde intrasitoplazmik morulaların doğrudan mikroskobik tespiti çok hızlı ve pratiktir. Sonuç pozitifse, derhal gerekli tedavi başlatılabilir. Ancak bu yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü çok düşüktür. Özellikle, enfekte nötrofil granülositlerin düşük yüzdesi, dolaşımdaki kan hücrelerinin sadece küçük bir yüzdesinin değerlendirilmesi, morulaların sadece hastalığın ilk haftasında ortaya çıkması, aynı zamanda hücre içi artefaktlardan kaynaklanan yanlış yorumlamaların da olabileceği dikkate alınmalıdır. Bununla birlikte, "buffy coats" kullanımı mikroskobik muayenin duyarlılıklarını artırabilmektedir (Aguero-Rosenfeld, 2002, Schotthoefer ve diğerleri, 2013)

PCR tabanlı teşhis, özellikle gerçek zamanlı PCR, mikroskobike göre çok daha hassastır. PCR tabanlı teşhiste groEL operonu veya “majör yüzey proteini 2” (msp2) genleri sıklıkla hedeflenen genlerdir (Schotthoefer ve diğerleri, 2013).

Serolojik tespit yöntemleri sıklıkla gerçekleştirilir, ancak bunlar bir enfeksiyonun akut fazında çok bilgilendirici değildir. Daha önce belirtildiği gibi, yalnızca bir kez pozitif titre, mevcut bir enfeksiyon veya patojenle önceki temas arasında bir ayrım yapılmasına izin vermemektedir. Bir serokonversiyonun saptanması veya antikor titresinde en az dört kat artış, yalnızca geriye dönük bir tanıya izin verir, ancak çok hassas yöntemler olarak kabul edilir (Bakken ve diğerleri, 2002). SNAP4Ds hızlı testinin kullanılması, IFAT kullanılarak antikor tespitine hızlı bir alternatiftir ve epidemiyolojik araştırmalar için bir tarama testi olarak uygundur (Veronesi ve diğerleri, 2014). Ancak, SNAP4Ds hızlı testinin sonuçları farklı bir yöntemle doğrulanmalıdır (Barth ve diğerleri, 2014).

Başka bir tanı yöntemi, *A. phagocytophilum*'un farklı hücre kültürü ortamlarında yetiştirilmesidir. Bu uygulama işlemi gelişmiş ve özel laboratuvarlarda gerçekleşmekte olup, sıklıkla HL60 hücreleri kullanılmaktadır (Carlyon, 2005).

Atlarda, hayvanlarda ve insanlarda tetrasiklinler, özellikle doksisiklin ve oksitetrasiklin kullanımı etkili bir granülositik anaplazmoz tedavisi sağlamaktadır. Hayvanlarda oksitetrasiklin, sülfametazin, sülfadimidin, doksisiklin ve trimetoprim-sülfonamidler gibi antibiyotikler kullanılmaktadır (Carrade ve diğerleri, 2009; Little 2010; Dzięgiel ve diğerleri, 2013; Ismail ve diğerleri, 2010).

HGA'dan muzdarip hastalar, hastanın ateşi en az 3 gün düşene kadar günde iki kez 100 mg doksisiklin terapisine tabi tutulmaktadır. Bu ilaç, bakteriyle enfekte olan hastalar için en faydalı olanıdır. Diğer bazı tetrasiklin ilaçları da etkili olmaktadır. Genel olarak, kene maruziyetinden sonra HGA semptomları ve açıklanamayan ateşi olan hastalar, özellikle lökopeni ve / veya trombositopeni yaşıyorlarsa, tanısal testleri beklemedeyken semptomatik tedavi amacıyla doksisiklin tedavisi almalıdır (Ismail ve diğerleri, 2010).

## 2.2. Atlarda *Anaplasma phagocytophilum* Varlığı Üzerine Çalışmalar

Butler ve diğerleri (2008) tarafından Hollanda Utrect Universitesi’nde 1 -16 yaş arasında değişen 61 at üzerinde yapılan çalışmada, farklı cinslerden altı atta anaplasmosis teşhis edilmiştir. Klinik belirtileri olarak uyuşukluk, yüksek ateş (38,7°C ila 41,1°C), arka bacaklarda ödem, bacakların hepsinde ya da kısmi olarak felç gözlemlenmiştir. Hematolojik sonuçlar nispeten düşük hücre hacmi ortaya çıkarmıştır (23-29 l/l, referans aralığı 30 ila 42 l/l) ve bu atların dördünde belirgin trombositopeni (22-26 x 109 /l, referans aralığı > 100 x 109 /l) tespit edilmiştir. Anaplasmosise bağlı olarak nötrofillerde sitoplazmik inklüzyonlar görülmüştür. Beş at hafif klinik belirtiler gösterirken, atlar tedavi olmadan hastalığı atlatmışlardır.

Franzen ve diğerleri (2009) *Anaplasma phagocytophilum* bazı memeli türlerini enfekte ettiğini; koyun, köpek ve buzağılarda kalıcı olabileceğini belirtmiştir. Bununla birlikte, bu organizmanın atlarda kalıcı olup olmadığını veya uzun süreli klinik anormalliklere neden olup olmadığı bilinmediğini belirtmişlerdir. Yaptıkları çalımada *A. phagocytophilum*'un atlarda kalıcı olup olmadığını değerlendirmek ve akut hastalığın tam iyileşmesinden sonra 3 ay boyunca klinik bulguları belgeleyerek bu durumu açıklığa kavuşturmaya çalışmışlardır. Bunun için *A. phagocytophilum*'un bir İsveç at izolatının neden olduğu deneysel olarak indüklenen akut hastalıktan spontan olarak iyileşen klinik olarak normal beş yetişkin at kullanılmıştır. Atlar, aşılamadan sonraki 129 güne boyunca günlük klinik muayene ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve kan yaymalarında *A. phagocytophilum* kanıtı için en az gün aşırı kan örneklemesi ile izlenmiştir. Tüm atlara ötenazi uygulanmış ve otopsi yapılmıştır. Tüm atlar, akut enfeksiyondan kurtulduktan sonra periyodik olarak PCR pozitif çıkmıştır. Aşılamadan sonra 66. günden önce 2 at sürekli olarak PCR sonuçları negatifken, 3 at aralıklı olarak PCR sonuçları pozitif bulunmuştur. Daha sonra, özellikle stresi taklit eden müdahalelerden sonra, 5 atın 4'ü aralıklı olarak PCR sonucu pozitif bulunmuştur. Bir hayvan, ölüm sonrası incelemeden hemen önce pozitif olduğu tespit edilmiştir. Anaplazmanın kalıcılığına bağlı klinik anormallikler gözlenmiş ve postmortem incelemede hiçbir spesifik değişiklik bulunmamış ve atlardan alınan tüm dokular *A. phagocytophilum* için PCR sonucu negatif bulunmuştur. Araştırma sonucunda *A. phagocytophilum* enfeksiyonu atlarda en az 129 gün devam edebileceği belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, organizmanın devam eden varlığı, saptanabilir klinik veya patolojik anormallikler ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir.

Hansen ve diğerleri (2010) tarafından Danimarka'nın tüm önemli bölgelerinden ve Danimarka at populasyonunun yoğunluğuna karşılık gelen bir coğrafi dağılım gözetilerek toplanan 390 kan örneği üzerinden araştırma yapılmıştır. Tüm numuneler, SNAP®4DX® ELISA testi kullanılarak *B. burgdorferi* ve *A. phagocytophilum*'a karşı antikorların varlığı açısından incelenmiştir. Genel olarak, atların %29,0’ı *B. burgdorferi* için seropozitif iken, %22,3'ü *A. phagocytophilum* için seropozitif olduğu tespit edilmiştir.

Passamonti ve diğerleri (2010), Orta İtalya'da atlarda *A. phagocytophilum* ile birlikte *Theileria equi* ve *Babesia caballi*’nin varlığını IFAT ve nested PCR tanı yöntemleri kullanarak araştırmışlardır. Bu çalışmada ayrıca 114 kene 16S rRNA'yı hedefleyen PCR ile *A. phagocytophilum*'un varlığı açısından incelenmiştir. *A. phagocytophilum*'a karşı seroprevalans %17.03 olarak tespit edilmiş ve 11 at (%8.14) nested PCR ile pozitif bulunmuştur. Atların üzerinden toplanan kenelerden (*R. sanguineus* (n=22; %19.29), *Hae. punctata* (n=21; %18.42), *H. marginatum* (n=24; %21.05), *D. marginatus* (n=5; %4.38), *I. ricinus* (n=42; %36.82%) oluşturulan hazuzların hiçbirinde *A. phagocytophilum* tespit edilmemiştir.

Salvagni ve diğerleri (2010) tarafından Brezilya’nın orta batı bölgesinde anaplasmosis ajanı ve doğal vektörleri hakkında yapılan araştırmada *A. phagocytophilum* ajanına maruz kalan atların serolojik ve moleküler tekniklerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmada 20 at kanı ve serum örneği, buffy coat sürme preparatının mikroskobik incelemesi, ELISA testi, indirekt floresan antikor testi (IFAT) ve nested PCR ile değerlendirilmiştir. Ek olarak, *Theileria equi*'nin IFAT ve ELISA ile serolojik tanısı ve nested PCR ile moleküler tanısı gerçekleştirilmiştir. On üç (%65) serum örneği, ELISA ile *A. phagocytophilum* için pozitif olarak belirlenirken, buffy-coat yayma preparatlarını analizi veya nested PCR negatif olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber *T. equi’*ye karşı antikorlar IFAT ve ELISA ile sırasıyla 18 (%90) ve 17 (%85) atta tespit edilirken, dokuz at (%45) nested PCR ile pozitif olarak tespşt edilmiştir.

M'ghirbi ve diğerleri (2012) tarafından Kuzey Tunus’ta atlar üzerine yapılan çalışmada 60 atta *A. phagocytophilum*'un varlığı IFAT ve 16S rRNA genine ait primerler kullanılarak nested PCR ile araştırılmıştır. *A. phagocytophilum* bulaşma riskini incelemek için atlardan toplanan 154 kene, 16S rRNA genini hedefleyen iç içe PCR ile *A. phagocytophilum* varlığı açısından incelenmiştir. Tunus’ta yapılan bu çalışmada, atlarda *A. phagocytophilum* seroprevalansı %67 olarak tespit edilmiştir. Seroprevalansın önemli bölgesel ve cinsiyet farklılıkları göstermediği belirtilmiştir. PCR'da ise atların sekizi (%13) *A. phagocytophilum* için pozitif çıkmıştır ve pozitif atlarda önemli bir cins ve yaş farkı bulunmamıştır. Çalışmanın yapıldığı bölgede ve zaman diliminde atlarda *H. marginatum* (130/154)’un baskın bir şekilde tespit edilmiş, bunların üçünün ise (%2,3) *A. phagocytophilum* ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada sunulan sonuçlar ışığında Tunus'ta kenelerin istila ettiği atların *A. phagocytophilum*'a maruz kaldığını göstermektedir.

Lee ve diğerleri (2015) tarafından ticari bir ELISA kiti ve iki farklı nested PCR analizi kullanarak Kore'de yetiştirilen atlarda *A. phagocytophilum*'un ülke çapında yaygınlığı araştırılmıştır. Araştırma 2009 ila 2013 yılları arasında yaklaşık 30.000 at bulunan Kore’de seçilen 549 atttan alınan serum örneklerinde gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu, atların %2,9’unun ELISA ile seropozitif olduğunu ve hiç birinin iki nested PCR analizinde pozitif olmadığı gözlenmiştir.

Rolim ve diğerleri (2015) tarafından Brezilya’nın Rio de Janeiro eyalinde yapılan *A. phagocytophilum’*a karşı gelişen antikorların varlığını araştırmak için eyalet polis alayından 50 at ve süvari alayından 41 at seçilerek toplanan örneklerde IFAT yapılmıştır. Çalışmada, 91 at serumu örneklerinden 12’sinde 1:80 ve üzerinde *A. phagocytophilum* antikor titresi tespit edilmiştir. Her yaştan hayvanda antikor saptanmasına rağmen, yaşları 5 ile 14 arasında değişen yetişkin hayvanlar en yüksek pozitif reaksiyon oranını göstermış, ırklar arasında bir fark gözlenmemiştir.

Seo ve diğerleri (2018) tarafından Kore'de atlarda nükleotid dizileme ve sınırlayıcı enzim parça uzunluğu çeşitliliği (Restriction fragment length polymorphism – RFLP) ile yapılan çalışmada 627 atta *A. phagocytophilum* varlığı araştırılmıştır. Çalışmaya dâhil edilen atlardan yalnızca 1'inde (% 0,2) *A. phagocytophilum* tespit edilmiştir. Tespit edilen *A. phagocytophilum*'un dizisi diğer ülkerlerdeki atlardan izole edilen *A. phagocytophilum*’un 16S rRNA dizilerine % 99,5-100 oranlarında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışma, *A. phagocytophilum*'un Kore'deki atlarda ilk moleküler tespitidir. Son zamanlarda Kore'de insan granülositik anaplazmozu ve *A. phagocytophilum*'un hayvan enfeksiyonu bildirilmiştir. Araştırıcılar, bu çalışmada düşük bir enfeksiyon prevalansı tespit edilmiş olsa bile insanlara bulaş riskinin olası olduğu ve hastalık dağılımını ve insanlara olası bulaşı önlemek için *A. phagocytophilum* için sürekli gözetim ve etkili kontrol önlemleri oluşturulması elzem vurgulanmıştır (Seo ve diğerleri, 2018).

Razzaq ve diğerleri (2015) Güney Pencap (Pakistan)’da yer alan iki farklı bölgede (Dera Ghazi Khan ve Khanewal ilçeleri) atlarda *A. phagocytophilum* varlığını PCR ve PCR-RFLP yöntemleriyle araştırmıştır. İncelenen 210 atın 9’u (%4,3) hem *Anaplasma* spp. PCR ile,hem de PCR-RFLP ile pozitif bulunmuştur. Ek olarak, hayvanların yaş, cinsiyet, tür gibi özelliklerinin *Anaplasma* spp.'nin varlığı ile anlamlı bir ilişkisinin olmadığı ortaya koyulmuştur.

Prado ve diğerleri (2018), Brezilya'nın Minas Gerais eyaletinde Manga-Larga Marchador ırkı atların yetiştirldiği iki farklı çiftlikteki *A. phagocytophilum* yaygınlığını IFAT, buffy-coat yayma preparatının mikroskobik incelemesi ve nested PCR tanı metodları kullanarak araştırmışlardır. İncelenen 172 attan 131’i (%76) IFAT ile serolojik olarak pozitif olduğu tespit edilmişitir. Buffy coat analizinde toplam %12,8'inin pozitif olduğu bulunurken, nested PCR ile örneklerin %1,94'ü enfeksiyona karşı pozitif bulunmuştur. Numunelerin dizilim analiz sonuçları *I. ricinus* kenesinden izole edilen *A. phagocytophilum* ile %96’lık benzerlik göstermiştir. Bu sonuçlar, değerlendirilen iki at yetiştirme çiftliğinde PCR ve Buffy coat ile de pozitifliği kanıtlanan *A. phagocytophilum* atlarda yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir.

Brezilya’da yapılan bir başka çalışmada ise (Marques dos Santos ve diğerleri, 2019), Rio de Janeiro eyaletinde atlarda *T. equi* ve *A. phagocytophilum’*un varlığını IFAT ile serolojik olarak, kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile moleküler olarak ortaya konulması amaçlanmıştır. Çalışmada Seropedica belediyesinden alınan toplam 98 serum numunesi kullanılmıştır. qPCR için DNA örnekleri hem tam kandan hem de buffy coat’tan hazırlanmıştır. IFAT ve qPCR sonuçları değerlendirildiğinde, *T. equi* için pozitif test edilen hayvanların sıklığı sırasıyla %89,8 (n = 88/98) ve %91,8 (n = 90/98) iken, *A. phagocytophilum* %17,4 (n = 17 / 98) ve %1,0 (n = 1/98) olarak bulunmuştur. Bu çalışmada da diğer çalışmalarda olduğu gibi, atlarda seropozitiflik oldukça yüksek tespit edilirken, PCR ile periferal kanda etkenin varlığıçok daha düşük oranlarda tespit edilebilmiştir.

## 2.3. Türkiye’deki Atlarda *Anaplasma phagocytophilum* Varlığı Üzerine Çalışmalar

Türkiye’de *A. phagocytophilum*’un varlığı kedi, köpek, koyun ve sığır gibi çeşitli hayvan gruplarında gösterilmiştir (Çakmak ve diğerleri, 1990; Arslan, 2005; Karagenç ve diğerleri, 2005; Sevinç ve diğerleri, 2006; Hoşgör ve diğerleri, 2015). Ancak Türkiye’de, etkenin atlardaki varlığı ile ilgili bugüne kadar sadece Günaydın ve diğerleri (2018) ve Oğuz (2021) tarafından gerçekleştirilen iki çalışma tespit edilmiştir.

Günaydın ve diğerleri (2018) Türkiye’de at granülositik anaplasmosisin nedensel ajanı olan *A. phagocytophilum*’un varlığının tespiti için ilk serolojik çalışmayı gerçekleştirmiştir. Bu amaçla Şubat-Nisan 2016 tarihleri arasında 3-24 yaş aralığında değişen 105 kısrak attan toplanan örneklerden alınan kan serumu anti-*A. phagocytophilum* IgG varlığı açısından incelenmiştir. At serumları % 8.57 seroprevalans oranında pozitif bulunmuştur.

Oğuz (2021) tarafından yapılan Muş ilindeki atlardaki *A. phagocytophilum*’un varlığı çalışmasın ilk defa moleküler ve filogenetik analiz gerçekleştirilmiştir. Küçük bir lokasyon olan Muş ilinde bakılan toplamda 93 attan kan örnekleri alınarak test edilmiştir. Çalışmada *A. phagocytophilum*'a karşı seroprevalans değeri % 8,6 bulunmuş, altı atın (% 6,4) nested PCR sonuçları pozitif bant göstermiştir.

Dünyamız uzun bir süredir küresel ısınmanın etkisi altındadır. Küresel ısınma ile artan sıcaklıklar beraberinde vektör canlı olarak bilinen kene, sinek gibi canlıların popülasyonlarında artışa sebep olmaktadır. Bu da daha fazla vektör kaynaklı hastalıkların görülmesine sebebiyet vermektedir. Yapılan çalışmalarda bölgemizin vektör potansiyelinin oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Bakırcı ve diğerleri (2012)’nin bölgemizde yaptıkları çalışmalarda *Hyalomma marginatum, Hyalomma excavatum, Hyalomma rufipes, Rhipicephalus (Boophilus)*, *Haemaphysalis parva, Ixodes ricinus* ve *Dermacentor marginatus* türü keneler tespit ettikleri bildirilmiştir. Bu da bizlere zoonoz bir bakteri olan ve ana vektörü *Ixodes ricinus* olduğu bildirilen (Parola ve Raoult, 2001) *Anaplasma phagocytophilum* türü bakterinin bölgemizde var olabileceğini düşünmemize neden olmuştur.

İnsanlarda, insan granulositik anaplasmosis, sığrlarda mera humması ve atlarda at granulositik anaplasmosise (Alessandra ve Santo, 2012) sebep olan türü bakterilerin varlığı hakkında bilgi sahibi olunması hem insan hem de hayvan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Hastalığın taşıdığı risk ve ekonomik kayıplar düşünüldüğünde epidemiyolojik çalışmalar hastalığın neden olduğu kayıpların önlenmesi ve hastalıkla mücadelesine yönelik gerekli bilgileri sağlamaktadır. Bu nedenle, tez çalışmasında Ege Bölgesi’ndeki (İzmir, Aydın, Denizli) atlarda *Anaplasma phagocytophilum* varlığının moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

## 3.1. Gereç

## 3.1.1. Çalışma Alanı

Çalışma için gerekli kan örnekleri, Ege Bölgesi’nde yoğun at yetiştirilen Aydın, Denizli, İzmir illerinden toplanmıştır. Örneklerin il ve ilçe bilgileri ve örnek adedi Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 11. Atlara ait cinsiyet, yaş, ırk ve lokasyon bilgileri.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Cinsiyet | Kısrak | | 58 |
|  | Aygır | | 128 |
| **Toplam** | | | **186** |
| Yaş | >2 | | 17 |
|  | <2; >8 | | 107 |
|  | 8> | | 62 |
| **Toplam** | | | **186** |
| Irk | İngiliz | | 40 |
|  | Rahvan | | 59 |
|  | Arap | | 68 |
|  | Yerli | | 10 |
|  | Halflinger | | 3 |
|  | Midilli | | 6 |
| **Toplam** | | | **186** |
| Lokasyon | Denizli | Merkez | 53 |
|  | Aydın | Bozdoğan | 2 |
| Nazilli | 46 |
| Efeler | 6 |
| İncirliova | 1 |
| Sultanhisar | 14 |
|  | İzmir | Seferihisar-Urla | 48 |
| Torbalı | 6 |
| Narlıdere | 10 |
| **Toplam** | | | **186** |

## 3.1.2. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması

Bu çalışmada, atlarda *A. phagocytophilum* varlığını araştırmak amacıyla daha önce ADÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim dalında yürütülen bir çalışma sırasında elde edilen 186 adet kan örneğinden yararlanılmıştır (Etik Kurul Karar No: 64583101/2018/067). Kan alınan atların yaş, ırk ve lokasyon bilgileri Tablo 5’te sunulmuştur. Kan örnekleri, farklı yaş ve cinsiyette, hastalık belirtisi gösteren ve göstermeyen hayvanlardan, steril iğne ucu kullanılarak vena jugularis’ten EDTA’li tüplere 5 ml alınmıştır. EDTA’li tüplere toplanan örneklerin her biri steril 1.5 ml’lik ependorf tüpler içerisine konularak DNA ekstraksiyonu için -20°C’de saklanmıştır.

## 3.2. Yöntem

Bu tez çalışmasında atlarda *A. phagocytophilum*’un varlığını belirlemek amacıyla nested PCR metodu kullanılmıştır. Aşağıda kullanılan yöntemler detaylı olarak verilmiştir.

### 3.2.1. DNA Ekstrasyonu

At kanı örneklerinden Promega Wizard Genomic DNA ekstraksiyon kiti (Promega Corporation, 1999) kullanılarak DNA ekstrakte edilmiştir. Ekstrasyon protokolüne göre: Öncelikle 1,5 ml’lik santtrifüj tüpü içerisine 300 μl kan üzerine 900 μl hücre parçalayıcı solüsyon eklenerek 5-6 defa alt-üst edilmek suretiyle karışımı sağlanmaktadır. Karışım oda sıcaklığı koşullarında 10 dk inkubasyonu sağlanır. İnkubasyon sonrasında 14000 devirde 1 dk 30 sn santrifüj işlemi gerçekleştirilir.

Dipte toplanan beyaz pelet oynatılmadan, üstteki süpernatant pipet yoluyla ortamdan uzaklaştırılır. Tüpte yaklaşık 10-20 μl kadar pelet kalmıştır. Örneklerimiz dondurulup çözüldüğü için çalışmamızda dipteki pelet üzerine 600 μl hücre parçalanma solüsyonu eklenmesi, alt-üst edilmesi, 10 dk inkübasyon ve sonra 14000 devirde 1 dk 30 sn santrifüj edilmesi tekrar yapılarak üsteki süpernatant uzaklaştırma işlemi tekrarlanmıştır. İşlemi üçüncü defa yapılmasına gerek duyulmamıştır. Elde edilen beyaz pelet üzerine 300 μl çekirdek parçalama solüsyonu eklenmiş, birkaç kez pipete edilerek karışması sağlanmış ve 37℃’de 1 saat inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyondan sonra üzerine 100 μl protein çöktürme solüsyonu eklenerek iyice karışması için vortekslenmiş ve sonra karışım 4 dk 30 sn 14000 devirde santrifüj edilmiştir.

Dip kısmında kahverengi protein peleti birikmiş olup üzerinde kaba partiküllerinden arınmış şeffaf sıvı kısım kalmıştır. Üstte kalan şaffaf kısım, daha önceden 1.5 ml’lik ependorf içerisine konulmuş oda sıcaklığındaki 300 μl isopropanolün üzerine eklenmiştir (dipteki tortu oynatılmadan). Bu karışım birkaç kez alt-üst edilerek karıştırılmış, sıvının içerisindeki beyaz DNA gözle görülebilir hale getirilmiştir. Sonrasında ependorf tüpü 14000 devirde 1 dk 30 sn santrifüj edilerek yukarıda görülen beyaz DNA’nın dibe yapışması sağlanmıştır. Isopropanol, dibe yapışmış olan beyaz pelet oynatılmadan dikkatlice dökülerek ependorf içerisine 300 μl %70’lik etanol eklenerek yeniden 14000 devirde 1 dk 30 sn santrifüj edilmiştir.

Epondorf içerisindeki etanol pipet yardımıyla veya dikkatlice dökmek suretiyle uzaklaştırılmış ve tüp temiz bir peçete üzerine ağzı açık şekilde yan olarak bırakılarak 10-15 dk tüp içerisinde kalan etanolün iyice buharlaşması sağlanmıştır. Etanolün tamamen buharlaştığın emin olunduktan sonra DNA üzerine 100 μl DNA rehidrasyon solüsyonu eklenerek 1 saat 65℃’de inkubasyonda tutulurak veya +4℃’de bir gece bekletilerek DNA’nın rehidre olması sağlanmıştır. Bundan sonra elde edilen DNA ekstratı, -20℃’de PCR yapılıncaya kadar saklanmıştır.

### 3.2.2. Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Atlardan toplanan kan örneklerinden elde edilen DNA örneklerinde *A. phagocytophilum’*un varlığı 16S subunit rRNA genine ait primer çiftleri kullanılarak nested PCR ile belirlenmiştir. Bu amaçla Massung ve diğerleri (1998) tarafından bildirilen primerler kullanılmıştır. Primer çiftlerinin detayları Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 12. *Anaplasma phagocytophilum* türüne özgü primerlerin özellikleri

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Hedef gen bölgesi** | **Primer çiftleri** | **Dizilim (**5'-3' yönünde) | **Amplikon büyüklüğü** | **Kaynak** |
| Birinci PCR | ge3a  ge10r | F: CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC  R: TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC | 932 | Massung ve diğerleri., 1998 |
| İkinci PCR | ge9f  ge2 | F: AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT  R: GGCAGTATTAAAAGCAGCTCCAGG | 546 | Massung ve diğerleri., 1998 |

\*‘F’ ve ‘R’ harfleri sırası ile ileri ve geri yönlü dış primerleri belirtmek için kullanılmıştır.

*Anaplasma phagocytophilum* ajanının birinci basamak PCR amplifikasyonu, 16S subunit rRNA geninin 919 bp'lik kısmını çoğaltmak için ge3a - ge10r primer çifti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu final hacimi 25 µl olacak şekilde 1,5 mM MgCl2, 200 µM dNTP’s, 1,5 U Hotstart Taq DNA polimeraz (VitaTaq®, Procomcure Biotech, Salzburg Avusturya), 25 µM ileri ve geri yönlü primerler (ge3a - ge10r) ve 1 µl şablon DNA (10-20ng) kullanılarak yapılmıştır. Otomatik termal ısı döngüleyici (thermalcycler) cihazında (Veriti; Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD); 95 ℃’de 5 dk ön denatürasyondan sonra, toplam 35 döngü olacak şekilde 94℃ 50 saniye denatürasyon, 55℃ 50 saniye bağlanma ve 72℃ 1 dk zincir uzaması yapılmış, bunu 72℃’de 10 dakika son uzama takip etmiştir.

Elde edilen PCR ürünlerinden 1 µl örnek ikinci basamak PCR’da kullanılmıştır. İkinci basamak PCR final hacmi 50 µl olacak şekilde birinci basamak PCR reaksiyonunda kullanılan oranlarda hazırlanmıştır. Türe özgü nested PCR, 16S subunit rRNA geninin 546 bp'lik kısmını çoğaltan ge9F ve ge2 primer çifti kullanılarak birinci basamak PCR koşullarında gerçekleştirilmiştir. Herbir PCR reaksiyonu gerçekleştirilirken pozitif ve negatif kontrol örnekleri kullanılmıştır. Pozitif kontrol DNA örneği, ADÜ, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı’nda gerçekleştirilen diğer çalışmalar sırasında elde edilen örneklerden sağlanmıştır. Negatif örnek olarak DNA içermeyen su örneği kullanılmıştır. PCR ürünleri 10 µl/ml SybrGreen (SafeViewTM, ABM Inc., Kanada) içeren %1,5 agaroz jelde, Tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu içinde 100 voltluk elektroforeze tabii tutulduktan sonra UV ışık altında incelenmiştir.

### 3.2.3. PCR Ürününün Klonlanması ve DNA Dizileme Analizi

Parazitoloji Anabilim Dalında daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen *A. phagocytophilum* pozitif kontrol DNA’sı kullanılarak doğru ürün elde edilip edilmediğini belirlemek amacıyla nested PCR yapılmıştır. Yapılan PCR neticesinde pozitif olduğu belirlenen DNA örneğinden saflaştırılan PCR ürünleri, TOPO TA Klonlama Kiti (Invitrogen, Thermofisher, ABD) kullanılarak üretici firma tarafından verilen protokole uygun şekilde klonlanmıştır. Bu amaçla, 6 µl son hacimde; 4 µl PCR ürünü + 1 µl tuz solüsyonu + 1 µl pCR™4-TOPO™ vektörü olacak şekilde klonlama reaksiyonu hazırlanmıştır. Reaksiyon 22-23°C’de termal bloklarda (Techne, ABD) 5-10 dakika (klonlanacak olan bölgenin boyutuna göre süre uzatılmış) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon esnasında -80°C dondurucuda saklanan One Shot™ kimyasal olarak komponent *Escherichia coli* (Invitrogen, Thermofisher, ABD) hücreleri buz üzerine alınmıştır.

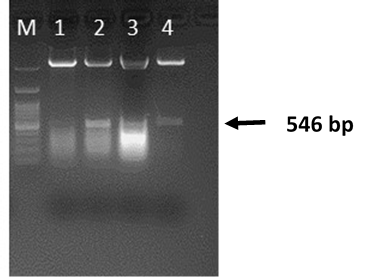
İnkubasyon sonrasında, klonlanmış PCR ürününü içeren pCR™4-TOPO™ vektörünün *E. coli* hücrelerinin içine kimyasal yolla transforme edilmesi için klonlama reaksiyonundan 2 µl alınarak *E. coli* hücrelerinin üzerine eklenmiş ve buz üzerinde 30 dakikalık inkübasyonun ardından hücreler, çalkalamaksızın dikkatli bir şekilde 42°C’de 30 saniye su banyosunda (Memmert, Almanya) ısı şokuna tabii tutulmuştur. Bu işlem sonrası, direkt buz üzerine alınan hücrelerin üstüne 250 µl S.O.C medyum eklenmiş ve çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific, Kanada) yatay olarak 220 rpm’de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, SOC medyum içindeki hücreler, içerisinde 50 μg/ml Ampisilin bulunan LB agar üzerine ekilerek gece boyu kolonilerin üremesi için 37°C’de etüvde (Memmert, Almanya) inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün üreyen kolonilerden seçilerek içerisinde 100 μg/ml Ampicilin bulunan LB medyum içinde 37°C’de çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific, Kanada) 200 rpm’de gece boyunca üremeye bırakılmış ve ertesi gün üreyen kolonilerden önce gliserol stokları hazırlanarak (500 µl üreyen hücre + 500 µl %50 gliserol) hücreler -80ºC’de daha sonra kullanılmak üzere saklanmıştır. Geriye kalan hücrelerden PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kiti (Invitrogen, Thermofisher, ABD) kullanılarak klonlanmış gen bölgelerin içeren plasmid DNA’lar üretici firma tarafından tarif edildiği şekilde pürifiye edilmiştir. Daha sonra, elde edilen plazmid DNA miktarları spektrofotometrik (Multiskan Go, Thermo Scientific, ABD) olarak ölçüldükten sonra *EcoR*I restriksiyon enzimi (Invitrogen Thermo Scientific, ABD) ile kesilerek doğru uzunluktaki ilgili gen bölgesinin pürifiye edilmiş olan plasmid içerisinde olup olmadığı teyit edilmiştir. Bu amaçla, 20µl son hacimde; 10X buffer, 1 μg pürifiye plazmid DNA’sı ve 1 U EcoRI restriksiyon enzimi bulunan solüsyon içerisinde 37°C’de 15 dakika ve takibinde 80°C’ de 5 dakikalık inkübasyonlar ile plasmid vektör ilgili bölgelerinden kesilmiştir. Kesilen ürünler, %1,5 agaroz jelde 100 voltluk akımda bir saat boyunca elektroforeze tabi tutulmuş ve UV ışık içeren görüntüleme cihazında (EC3 Imaging System, ABD) kesilen ürünlerin uzunluklarına bakılarak, ilgili gen bölgesinin vektör içerisine klonlanlanıp klonlanmadığı doğrulanmıştır.

Hem birinci basmak PCR hem de nested PCR ürününden elde edilen plazmid DNA’larının dizilim analizleri hizmet alımı olarak Triogen Biyoteknoloji (İstanbul) firmasında yaptırılmıştır.

# 4. BULGULAR

## 4.1. Klonlama ve Dizileme Analiz Sonuçları

Atlardan alınan kan örneklerinin PCR kullanılarak analizleri yapılmadan önce nested PCR ile elde edilen ürünlerin *A. phagocytophilum*’a ait olup olmadığını belirlemek amacıyla öncelikle pozitif kontrol örneğinden elde edilen PCR ürünlerinin dizileme analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yukarıda yöntem bölümünde anlatıldığı gibi PCR ürünleri TOPO-TA klonlama kiti kullanılarak klonlanmıştır. Klonlanan *E.coli* hücrelerinin LB agar üzerine ekilerek elde edilen kolonilerden bir kaçı seçilerek LB medyum ile üretilmiş ve PCR ürünlerinin başarı ile bağlandığı tespit edilen plasmidlerin dizileme analizleri yaptırılmıştır (Resim 2).



Resim 2. Plasmid DNA’sının EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonrası *Anaplasma phagocytophilum* nested PCR ürününün plasmid içerisinde varlığının gösterilmesi. 2 ve 4 numaralı kuyucuklarda PCR ürünün plasmid içerisine başarılı bir şekilde klonlandığı görülmektedir. Kuyu 1 ve 3’de ise beklenilen uzunlukta bir ürüne rastlanmamıştır. M: 100 bp marker

## 4.2. DNA Dizilim Sonuçları

Pozitif *A. phagocytophilum* DNA’sı kullanılarak yapılan nested PCR’dan elde edilen ürünlerin ne olduğunu belirlemek amacıyla, elde edilen hem birinci basamak hem de ikinci basamak PCR ürünleri “3.2.3. PCR Ürününün Klonlanması ve DNA Dizileme Analizi” başlıklı bölümde anlatıldığı gibi klonlanmış ve pozitif plasmidlerin sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizilim sonuçları NCBI veri tabanında (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) BLAST analizleri yapılmıştır. BLAST analizleri sonucunda birinci basamak PCR ile elde edilen PCR ürünü %99.79 oranında *Anaplasma* sp.’ye benzerlik göstermiştir (Şekil 3). İkinci basamak nested PCR ürününün ise %99.45-99.61 arasında *A. phagocytophilum*’a benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4) .

|  |  |
| --- | --- |
| **ge3a** | **CACAATGCAAGTCGAACGGATTATTC** |
| **ge10r** | **TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC** |

> *A. phagocytophilum* I.basamak (482 bp) %99.79 Anaplasma sp.

TGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTT

GGAATTCAGAGTTGGATCCTGGTTCAGAACGAACGCTGGCGGCAAGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGACCGTACGCGCAGCTTGCTGCGTGTATGGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTGCCTAGTAGTATAGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGGAAAGATTTATCGCTACTAGATGAGCCTATGTCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGGCTGTGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTCAGTAGGGAAGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACTCGGGATCCCG

GGTTTGCCGGGACTTTTTCTGAACCATGATCCAACTCTGAATTCCAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCRRGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG

Şekil 3. *Anaplasma phagocytophilum* birinci basamak nested PCR ürününün sekans analiz sonucu.

|  |  |
| --- | --- |
| **ge9F** | **AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT** |
| **ge2** | **GGCAGTATTAAAAGCAGCTCCAGG** |

> *Anaplasma phagocytophilum* nested %99.45-99.61 *Anaplasma phagocytophilum*

TGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTT

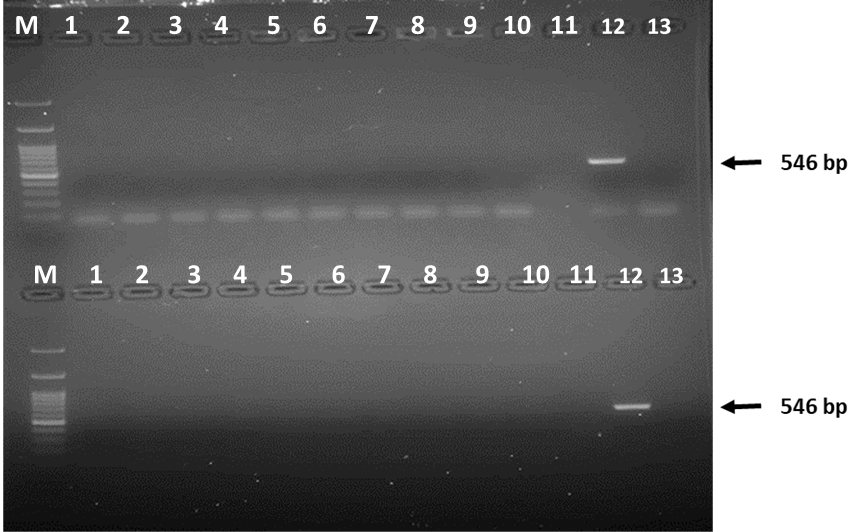
AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCTATGAAGAATAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTCAGTGGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGGCAAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCA

AGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG

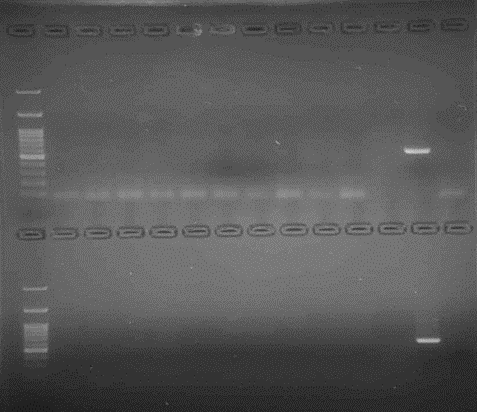
Şekil 4. *Anaplasma phagocytophilum* nested PCR ürününün ikinci basamak ürününün sekans analiz sonucu.

## 4.3. PCR Testi Bulguları

Ege Bölgesinin farklı bölgelerinde yetiştirilen atlarda *Anaplasma phagocytophilum* varlığı, ekstrate edilmiş DNA örneklerinde, 16S subunit rRNA genine özgü primerler kullanılarak nested PCR ile yöntem bölümünde belirtildiği gibi araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda 69'u Aydın'dan, 53'ü Denizli'den ve 64'ü de İzmir’den olmak üzere, test edilen 186 attan alınan kan örneğinden hiç birinde *A. phagocytophilum*’un varlığı tespit edilememiştir. Denizli ve İzmir bölgesindeki atlardan elde edilen DNA örneklerine ait nested PCR reaksiyonlarının agaroz jel görüntüleri Resim 3 ve 4’de gösterilmiştir.



Resim 3. İzmir-Urla’dan alınan at kanı örneklerinin *Anaplasma phagocytophilum* nested PCR reaksiyonu agaroz jel elektroforesis görüntüsü. 1-10 numaralı kuyular Denizli’deki atlardan alınan (n=20) kan DNA örnekleri. Kuyu 11: boş, Kuyu 12: pozitif *A. phagocytophilum* DNA örneği; Kuyu 13: Negatif örnek (su); M: 100 bp moleküler marker.



**M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13**

**M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13**



Resim 4. Denizli ilinden alınan at kanı örneklerinin *Anaplasma phagocytophilum* nested PCR reaksiyonu agaroz jel elektroforesis görüntüsü. 1-10 numaralı kuyular Denizli’deki atlardan alınan (n=20) kan DNA örnekleri. Kuyu 11: boş, Kuyu 12: pozitif *A. phagocytophilum* DNA örneği; Kuyu 13: Negatif örnek (su); M: 100 bp moleküler marker.

# 5. TARTIŞMA

At granülositik anaplazmozun etken maddesi olan *Anaplasma phagocytophilum*, insan dışında at dâhil olmak üzere çeşitli vahşi ve evcil memeli türlerini etkiler (Günaydın ve diğerleri, 2018). At granülistik anaplasmosis (EGA)'in kene ısırmalarından sonra yaklaşık 10 günlük bir kuluçka süresi bulunmaktadır (DziĊgiel ve diğerleri, 2013). Hastalık sonucu görülen tipik semptomlar; ateş, depresyon, anoreksi, alt ekstremite ödemi, sarılık, peteşi oluşumu, hareket etme isteksizliği ve ataksidir (Madigan ve Pusterla, 2000). Deneysel olarak enfekte olmuş atlarda, fizyolojik türbülansa atfedilen geçici bir sistolik kalp üfürümü de rapor edilmiştir (Madigan, 1993; Franzén ve diğerleri, 2005). Laboratuvar bulguları trombopeni, lökositoz veya lökopeni, anemi ve hiperbilirubinemi ile karakterizedir (DziĊgiel ve diğerleri, 2013).

Anaplasmolisisin tanısı, Giemsa boyama yöntemiyle nötrofil granülositlerinde tipik inklüzyonların (moruale) saptanması ya da nested PCR ile EDTA tüpleriyle alınan kan örneklerinde *A. phagocytophilum* DNA'sının saptanmasıyla konulmaktadır. Nested PCR ile tespit yönteminin mikroskobik incelemeden daha hassas olduğu kanıtlanmıştır (Franzén ve diğerleri, 2005). Sıklıkla uygulanmasına rağmen, serolojinin kullanımı çok sınırlıdır, çünkü enfeksiyonun akut fazındaki hayvanlar genellikle seronegatiftir (Franzén ve diğerleri, 2005). Buna rağmen serolojik tespit yöntemleri sıklıkla gerçekleştirilmektedir, ancak bunlar bir enfeksiyonun akut fazında çok bilgilendirici değildir. Bununla beraber birbirini takip eden iki serolojik muayenin ikincisinin pozitif olarak belirlenmesi iki test arasında konağın *Anaplasma* spp. ile karşılaştığının bilgisini vermektedir (Aguero-Rosenfeld, 2002; Bakken ve diğerleri, 2002; Allison ve Little, 2013; Schotthoeffer ve diğerleri, 2013; Barth ve diğerleri, 2014). Ek olarak, serolojik tanı testleri hastalığın epidemiyolojisik araştırmalarında önemli sonuçlar sunmaktadır.

Anaplasmosis yaygınlığını belirlemeye yönelik olarak Avrupa'da (von Stedingk ve diğerleri, 1997; Pusterla ve diğerleri, 1998; Baumgarten ve diğerleri, 1999; Fingerle ve diğerleri, 1999; Schouls ve diğerleri, 1999; Christova ve diğerleri, 2001; Polin ve diğerleri, 2004) ve ABD'de (Courtney ve diğerleri, 2003) *Ixodes scapularis* veya *Ixodes ricinus* kenelerinde *A. phagocytophilum*’un yaygın olarak bulunduğu belirlenmiştir. Bunun dışında *A. phagocytophilum*’un varlığı, *I. persulcatus* kenelerinde de tespit edilmiştir (Cao ve diğerleri, 2003). Bu çalışmalara bakıldığında sayıca fazla olan yaygınlık çalışmalarının genellikle keneler üzerinden yapıldığı görülmektedir. Çünkü potansiyel konakçı ve rezervuar hayvanların durumu *A. phagocytophilum*'un coğrafi dağılımını etkileyen en büyük faktörlerden biridir (Fingerle ve diğerleri.,1999). Bunun haricinde; Butler ve diğerleri (2008) tarafından Hollanda’da, Franzen ve diğerleri (2009) tarafından İsveç’te, Hansen ve diğerleri (2010) tarafından Danimarka’da, Passamonti ve diğerleri (2010) tarafından orta İtalya’da, Salvagni ve diğerleri (2010) tarafından Brezilya’nın orta batı bölgesinde, Lee ve diğerleri (2015) tarafından Kore'de, Rolim ve diğerleri (2015) ve Marques dos Santos ve diğerleri (2019) Brezilya’nın Rio de Janeiro eyalinde, Prado ve diğerleri (2018) tarafından Brezilya'nın Minas Gerais eyaletinde, Seo ve diğerleri (2018) tarafından Kore'de, Razzaq ve diğerleri (2015) tarafından Güney Pencap (Pakistan)’ta serolojik ya da nested PCR yöntemiyle çalışmalar gerçekleştirilmiş ve atlarda *A. phagocytophilum*’un varlığı farklı coğrafi bölgelerde araştırılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları Tablo 4, Tablo 5, Tablo 6, Tablo 7, Tablo 8 ve Tablo 9’da verilmiştir. Nitekim bu çalışmalara bakıldığında bazılarında atlarda *A. phagocytophilum* varlığına rastlanmamışken bazılarında rastlanmıştır.

Türkiye'de ise atlar dışında hem sığır, koyun, kedi, köpek, fare, insan (Çakmak ve diğerleri, 1990; Arslan, 2005; Karagenç ve diğerleri, 2005; Sevinç ve diğerleri, 2006; Aktaş ve diğerleri, 2011) hem de kenelerde (Aktaş ve diğerleri, 2010) *A. phagocytophilum* varlığına ilişkin birçok rapor mevcuttur. Türkiye’de atlarda *A.phagocytophilum*’un varlığının tespiti için ilk çalışma Günaydın ve diğerleri (2018) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla IFAT ile Nevşehir ilinde bulunan (İç Anadolu Bölgesinde) genellikle turistik amaçla kullanılan 105 kısrak at kanı serumu Anti- *Anaplasma phagocytophilum* IgG antikorlarının varlığı açısından serolojik yöntemle incelenmiştir. At serumlarının seroprevalansı %8.57 oranında pozitif bulunmuştur. Oğuz (2021) tarafından Muş ilindeki atlarda yapılan çalışmada ise küçük bir lokasyon olan Muş ilinde bakılan toplamda 93 attan kan örnekleri alınarak test edilmiştir. Çalışmaya göre *A. phagocytophilum'*a karşı seroprevalans değeri % 8,6 bulunmuş, altı atın (% 6,4) ise nested PCR sonuçları pozitif bant göstermiştir. Nested PCR kullanılarak yapılan bizim çalışmamızda ise *A. phagocytophilum* varlığına ilişkin herhangi bir kanıt bulunamamıştır.

Bu tez projesi kapsamında atlarda *A. phagocytophilum* varlığına rastlanmamakla birlikte çalışmanın yapıldığı bölgede daha önce yapılan çalışmalarda hem farklı hayvan gruplarında etkenin varlığı hem de test edilen kenelerde varlığı gösterilmiştir. Ege Bölgesinde diğer hayvan gruplarında yapılan çalışmalarda *A. phagocytophilum* varlığına ilişkin kanıtlar bulunmaktadır. Ural ve diğerleri (2014) tarafından Ege Bölgesi köpeklerinde yapılan çalışmada *A. phagocytophilum* koenfeksiyonprevalansı % 10.42, *A. phagocytophilum* prevalansı ise 7.49 olarak tespit edilmiştir. Paşa ve diğerleri (2009) tarafından *Hepatozoon canis* ile doğal enfekte köpeklerin klinik ve laboratuvar bulgularınını belirlemek için yapılan çalışmada, incelenen 10 köpekten üçünde *A. phagocytophilum* tespit edilmiştir. Hoşgör ve diğerleri (2015)’nin yaptığı çalışmada Aydın ilindeki sığırlarda PCR ile %13,2 ila % 58,7 oranında yoğun olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada sığırlardan toplanan kenelerden *H. excavatum* ve *H. marginatum* kene havuzlarında *A. phagocytophilum* varlığı gösterilmiştir. Ancak bu keneler yarı doymuş erişkin keneler olduğu için pozitifliğin kenelerin beslenme sırasında almış olduğu kandan da ileri gelmiş olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Ceylan ve diğerleri (2021) tarafından Türkiye’nin batı bölgelerinde köpeklerde gerçekleştirilen *Anaplasma* spp., *Ehrlichia canis, Leishmania infantum* ve *Dirofilaria immitis* prevalansını incelemek için yapılan çalışmada *A. phagocytophilum* prevelansı %8.5 olarak tespit edilmiştir.

Ege Bölgesinde kene faunası üzerine de yapılan çalışmalar mevcuttur. Bunlardan Bakırcı ve diğerleri (2012) tarafından Türkiye'nin Batı Ege bölgesindeki sığırlarda kene türlerinin dağılımı ve mevsimsel aktiviteleri ile ilgili yapılan çalışmada sığırların %23’ünün enfekte olduğu tespit edilmiştir. Bölgede *Hyalomma marginatum, H. excavatum, H.rufipes, Rhipicephalus (Boophilus), Haemaphysalis parva, Ixodes ricinus* ve *Dermacentor marginatus* varlıkları tespit edilmiştir ki bunlardan *I. ricinus*, *A. phagocytophilum* için en önemli vektörlerden biridir (Bakırcı, 2009; Bakırcı ve diğerleri, 2012; Bakırcı ve diğerleri, 2014; Hoşgör ve diğerleri, 2015).

*Anaplasma phagocytophilum* konağa aktarımının en temel koşulu vektörlerin ortamda olmasıdır. Nitekim Ege bölgesinde *A. phagocytophilum* için vektörlük potansiyeli olan kenelerin var olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Bakırcı ve diğerleri, 2012). Ancak yapılan bu çalışmada atlarda herhangi bir *A. phagocytophilum* enfeksiyona rastlanmamıştır. Bundaki en önemli sebep atların yetiştirilme koşulları, dış çevreyle olan temas koşulları yani vektörle karşılaşmama (mera alanlarının durumu) durumu gibi nedenler olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim Ege Bölgesi’nde özellikle çalışmanın yapıldığı (Aydın, Denizli, İzmir) meraların azlığı, atların haralarda sürekli kontrol altında tutulması nedeniyle kenelerle temasın azalmış olduğu düşünülmelidir. Nitekim Muş gibi dar bir alan da bile Oğuz (2021) tarafından *A. phagocytophilum* varlığı tespit edilmiştir. Saleem ve diğerleri tarafından 1990 ila 2018 yılları arasında Dünya genelinde EGA prevalansı rapor edilen ülkeler ile Türkiye’nin çeşitli coğrafik alanları ve çalışma yapılan Ege Bölgesi değerlendirildiğinde iklim kuşağı olarak aynı olduğu görülmektesir (subtropik). Bunun haricinde sığır, koyun, köpek, fare, insan arasında *A. phagocytophilum* dolaşımına ilişkin birçok raporların bulunması (Çakmak ve diğerleri 1990; Arslan 2005; Karagenç ve diğerleri 2005; Sevinç ve diğerleri 2006) *A. phagocytophilum*’un atlarda görülme riskinin bulunduğunu ve daha geniş alanlarda çalışmanın tekrar edilmesinin önemini göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar PCR her ne kadar duyarlı bir teknik olsa da bakteriyeminin kısa sürdüğü *A. phagocytophilum* tanısında yetersiz kaldığını göstermektedir. Niketim yapılan pekçok çalışmada serolojik olarak pozitif olduğu gösterilen atların PCR ile doğrulanamadığı gözlenmektedir (Bakken ve diğerleri, 2002). Bu bulgular *A. phagocytophilum*’unyaygınlığı ile ilgili yapılacak çalışmalarda PCR, IFAT, ELISA ve buffy coat veya periferal kan yayma preparatlarının mikroskobik muayenesi gibi tanı yöntemlerinin birlikte kullanılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.Bu tez çalışmasında mali desteğin az olması, hazır tanı kitlerinin maliyetinin yüksek olması nedeniyle yanlızca moleküler tanı metodu kullanılabilmiştir.

Tüm tanı testleri, enfeksiyonun farklı aşamalarında optimal duyarlılık ve özgüllükten etkilenmektedir (Allison ve Little, 2013). Bakteriyeminin yüksek olduğu enfeksiyonun akut aşamasında doğrudan boyama testleriyle morulanın tespiti ve patojen DNA'sı tam kan örneklerinde kolayca tespit edildiğinden, enfeksiyonun akut aşamasında etkenin doğrudan tespitine yönelik testler daha yüksek performans göstermektedir. Bununla beraber, bakteriyeminin azaldığı, etkene karşı gelişen antikorların artış gösterdiği enfeksiyonun ilerleyen aşamasında indirekt testler daha yüksek performans göstermektedir (Lappin, 2018; Qurollo, 2019). Özellikle kan örneklerine uygulanan moleküler testler oldukça hassas ve spesifiktir ancak yanlış negatif sonuçlar oluşabilmektedir (Allison ve Little, 2013; Qurollo, 2019; Sainz ve diğerleri, 2015). *A. phagocytophilum*‘un tanısı amacıyla yapılan çalışmalarda moleküler testlerdeki negatif sonuçların, enfeksiyonun bulunmadığının kesin kanıtı olarak yorumlanmaması gerektiği, yalnızca ilgili nükleik asit dizisinin belirli bir numunede belirli bir zamanda tespit edilmediğini şeklinde yorumlanması gerektiğini ortaya koymaktadır (Allison ve Little, 2013; Sainz ve diğerleri, 2015, Balboni ve diğerleri, 2021). Bu nedenle, moleküler testler kullanılarak gerçekte var olan enfeksiyonların tespit edilemediği yani yanlış-negatifliğin yaygın olduğu görülmektedir. Bu durum serolojik testlerde pozitif ancak moleküler testlerde negatif durumların yaygın olarak rapor edilmesiyle ilişkilendirilmektedir (Solano-Gallego ve diğerleri, 2006: Ayllon ve diğerleri, 2009; Persichetti ve diğerleri, 2018). Son zamanlarda, yanlış negatif sonuçları azaltmak için pek çok enfeksiyonun varlığı kan örneklerinden farklı olarak saç gibi invaziv olmayan numuneleri içeren biyolojik matrislerin moleküler teşhisinde çabalar sarf edilmektedir (Belinchón-Lorenzo ve diğerleri, 2013; Manna ve diğerleri, 2004; Chatzis ve diğerleri, 2014; Urbani ve diğerleri, 2020). Kedilerde *A. phagocytophilum*‘un varlığını ortaya koymak amacıyla Balboni ve diğerleri (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, dalak, kan tüy ve kemik iliği örnekleri değerlendirilmiştir. Kan ve kemik iliğinde pozitiflik belirlenemezken, iki tüy örneğinde ve bir dalak örneğinde *A. phagocytophilum*’un varlığı gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan bu çalışmalar, moleküler tanı tekniklerin duyarlılığını aratırmak amacıyla kullanılabilecek invaziv veya invaziv olmayan yöntemlerle elde edilen vücut sıvılarından ve/veya saç/kılların hangisinin en iyi sonuç verdiğinin araştırılması gerekliliğini de ortaya koymaktadır.

# 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırma, Aydın, Denizli ve İzmir illerini kapsayan Ege Bölgesi’nde Anaplasmosis enfeksiyonuna neden olan *A. phagocytophilum* varlığı ile ilgili, Ege Bölgesi’nde ilk kez nested PCR yöntemiyle yapılmış, epidemiyolojik bir ön çalışmadır. Elde edilen veriler kapsamında çalışmanın yapıldığı alanda *A. phagocytophilum* varlığı tespit edilmemiştir. Oysaki daha önce diğer hayvan türlerinde hem serolojik hem de nested PCR yöntemiyle Anaplasmosis nedeni olan ajanlar tespit edilmiştir. Bu durum çalışmanın atlarda daha geniş bir coğrafik alanda tarama yapılmasını gerektirmektedir. Bunun haricinde yapılacak çalışmalarda hayvanların barınma koşullarının, iklimsel durumlarının ve vektör dağılımlarının tespitinin de yapılması verilerin daha iyi yorumlanmasını sağlayacaktır.

Bu ve benzeri çalışmalar; hastalığın taşıdığı risk ve ekonomik kayıplar bakımından değerlendirildiğinde; Anaplasmosisin neden olduğu kayıpların önlenmesi, hastalığın kontrol altında tutulabilmesi için genel bir değerlendirme sunması ve uygun stratejilerin belirlenmesi açısından elzemdir.

# KAYNAKLAR

Adelson, M. E., Rao, R. V. S., Tilton, R. C., Cabets, K., Eskow, E., Fein, L., Mordechai, E. (2004). Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella* spp., *Babesia microti*, and *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes scapularis* ticks collected in Northern New Jersey. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(6), 2799-2801.

Adaszek, Ł., Winiarczyk, S., Łukaszewska, J. (2009). A first case of ehrlichiosis in a horse in Poland. *DTW. Deutsche Tierarztliche Wochenschrift*, *116*(9), 330-334.

Adaszek, Ł.,Winiarczyk, S. (2011). Identification of *Anaplasma* spp. *Rickettsia* isolated from horses from clinical disease cases in Poland. *Zoonoses and Public Health*, *58*(7), 514-518.

Aguero-Rosenfeld, M. E. (2002). Diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis: state of the art. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *2*(4), 233-239.

Aktas, M., Altay, K.,Dumanli, N. (2011). Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey. *Ticks and Tick-borne Diseases*, *2*(1), 62-65.

Aktas, M., Vatansever, Z., Altay, K., Aydin, M. F., Dumanli, N. (2010). Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from Turkey. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *104* (1), 10-15.

Alberdi, M. P., Walker, A. R., Paxton, E. A., Sumption, K. J. (1998). Natural prevalence of infection with *Ehrlichia* (*Cytoecetes*) *phagocytophila* of *Ixodes ricinus* ticks in Scotland. *Veterinary Parasitology*, *78*(3), 203-213.

Alberdi, M. P., Walker, A. R., & Urquhart, K. A. (2000). Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. *Epidemiology and Infection*, *124*(2), 315-323.

Alessandra, T., Santo, C. (2012). Tick-borne diseases in sheep and goats: clinical and diagnostic aspects. *Small Ruminant Research*, *106*, S6-S11.

Alekseev, A. N., Dubinina, H. V., Van De Pol, I., Schouls, L. M. (2001). Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia, *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 2237–2242, http://dx.doi.org/10.1128/JCM. 39.6.2237-2242.2001.

Allison, R. W., Little, S. E. (2013). Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*, *42*(2), 127-144.

André, M. R. (2018). Diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia/Neoehrlichia* agents in terrestrial wild carnivores worldwide: implications for human and domestic animal health and wildlife conservation. *Frontiers in Veterinary Science*, 293.

Arslan, Ö. M. (2005). Türkiye’de hayvanlarda kene enfestasyonları ve kenelerin bulaştırdığı hastalıkların durumu. 14. *Ulusal Parazitoloji Kongresi (YM02-04) Eylül*, 18-25.

Atif, F. A. (2015). *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitology Research*, *114*(11), 3941-3957.

Ayllón, T., Villaescusa, A., Tesouro, M. A., Sainz, A. (2009). Serology, PCR and culture of *Ehrlichia/Anaplasma* species in asymptomatic and symptomatic cats from central Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, *15*, 4-5.

Bakırcı, S. (2009). *Batı Anadolu bölgesi sığırlarında görülen kene türleri ve yaygınlığı* (Doctoral dissertation, Bursa Uludag University (Turkey)

Bakırcı, S., Sarali, H., Aydin, L., Eren, H.,Karagenc, T. (2012). Distribution and seasonal activity of tick species on cattle in the West Aegean region of Turkey. *Experimental and Applied Acarology*, *56*(2), 165-178.

Bakırcı, S., Aysul, N., Eren, H., Ünlü, A. H., & Karagenc, T. (2014). Diversity of ticks biting humans in Aydın province of Turkey. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 61(2), 93-98.

Bakken, J. S., Dumler, J. S., Chen, S. M., Eckman, M. R., Van Etta, L. L., Walker, D. H. (1994). Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States: a new species emerging?. *The Journal of the American Medical Association*, *272*(3), 212-218.

Bakken, J. S., Haller, I., Riddell, D., Walls, J. J., Dumler, J. S. (2002). The serological response of patients infected with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Clinical Infectious Diseases*, *34*(1), 22-27.

Bakken, J. S.,Dumler, J. S. (2006). Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1078*(1), 236-247.

Balboni, A., Urbani, L., Morini, M., Dondi, F.,Battilani, M. (2021). Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in hair and spleen of cats revealed a possible underestimation of feline vector-borne pathogens. *Research in Veterinary Science*, *137*, 144-149.

Barlough, J. E., Madigan, J. E., Kramer, V. L., Clover, J. R., Hui, L. T., Webb, J. P.,Vredevoe, L. K. (1997). *Ehrlichia phagocytophila* genogroup rickettsiae in ixodid ticks from California collected in 1995 and 1996. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(8), 2018-2021.

Barlough, J. E., Madigan, J. E., Turoff, D. R., Clover, J. R., Shelly, S. M., Dumler, J. S. (1997). An *Ehrlichia* strain from a llama (Lama glama) and llama-associated ticks (*Ixodes pacificus*). *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(4), 1005-1007.

Barth, C., Straubinger, R. K., Müller, E., Sauter‐Louis, C., Hartmann, K. (2014). Comparison of different diagnostic tools for the detection of *Anaplasma phagocytophilum* in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, *43*(2), 180-184.

Baumgarten, B. U., Röllinghoff, M., Bogdan, C. (1999). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(11), 3448-3451.

Bayard-Mc Neeley, M., Bansal, A., Chowdhury, I., Girao, G., Small, C. B., Seiter, K., Aguero-Rosenfeld, M. E. (2004). In vivo and in vitro studies on *Anaplasma phagocytophilum* infection of the myeloid cells of a patient with chronic myelogenous leukaemia and human granulocytic ehrlichiosis. *Journal of Clinical Pathology*, *57*(5), 499-503.

Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Parejo, J. C., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Soto, M., Nieto, L. C. G. (2013). Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, *192*(1-3), 43-50.

Bender, C. M., Zingg, J. M., Jones, P. A. (1998). DNA methylation as a target for drug design. *Pharmaceutical Research*, *15*(2), 175-187.

Beytout, J., George, J. C., Malaval, J., Garnier, M., Beytout, M., Baranton, G., Postic, D. (2007). Lyme borreliosis incidence in two French departments: correlation with infection of *Ixodes ricinus* ticks by *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *7*(4), 507-518.

Bjöersdorff, A. L. (2005). Ehrlichiosis and Anaplasmosis, Part 2: *Anaplasma phagocytophilum* comb. nov. Infection. In: Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. Shaw S and Day M. (Hrsg.). Manson Publishing, London, 120-133.

Bjöersdorff, A., Christenson, D., Johnsson, A., Sjöström, A. C., Madigan, J.E. (1990). Ehrlichia equi infection diagnosed in horses in Sweden, *Svensk Veterinärtidning*, 42, 357–360.

Bjöersdorff, A. L., Svendenius, J. H., Owens, J. H., Massung, R. F. (1999). Feline granulocytic ehrlichiosis-a report of a new clinical entity and characterization of the infectious agent. *Journal of Small Animal Practices,* 40, 20-24

Blaňarová, L., Stanko, M., Carpi, G., Miklisová, D., Víchová, B., Mošanský, L., Derdáková, M. (2014). Distinct *Anaplasma phagocytophilum* genotypes associated with *Ixodes triangulicep*s ticks and rodents in Central Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases*, *5*(6), 928-938.

Bown, K. J., Lambin, X., Ogden, N. H., Begon, M., Telford, G., Woldehiwet, Z., Birtles, R. J. (2009). Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. *Emerging Infectious Diseases*, *15*(12), 1948.

Butler, C. M., Houwers, D. J., Jongejan, F., Van Der Kolk, J. H. (2005). *Borrelia burgdorferi* infections with special reference to horses. A review. *Veterinary Quarterly*, *27*(4), 146-156.

Butler, C. M., Nijhof, A. M., Jongejan, F., Van der Kolk, J. H. (2008). *Anaplasma phagocytophilum* infection in horses in the Netherlands. *The Veterinary Record*, *162*(7), 216.

Büscher, G., Gandras, R., Apel, G., Friedhoff, K.T. (1984). Der erste Fall von Ehrlichiosis beim Pferd in Deutschland (Kurzmitteilung). *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 91, 408–409.

Carlyon, J. A. (2005). Laboratory maintenance of *Anaplasma phagocytophilum*, p. 3A. 2.1-3A. 2.30. Current protocols in microbiology. *Journal of Wiley and Sons*, Hoboken, NJ.

Carrade, D. D., Foley, J. E., Borjesson, D. L.,Sykes, J. E. (2009). Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6), 1129-1141.

Cao, W. C., Zhan, L., He, J., Foley J. E., De Vlas, S. J., Wu, X. M., Yang, H., Richardus, J. H., Habbema, J. D. F. (2006). Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 75, 664–668.

Cao, W. C., Zhao, Q. M., Zhang, P. H., Yang, H., Wu, X. M., Wen, B. H., Habbema, J. D. F. (2003). Prevalence of *Anaplasma phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes persulcatus* ticks from northeastern China. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(5), 547-550.

Ceylan, O., Uslu, A., Ozturk, O.,Sevinc, F. (2021). Serological investigation of some vector-borne parasitic and Rickettsial agents in dogs in the western part of Turkey. *Pakistan Veterinary Journal*, *41*(3).

Chae, J. S., Yu, D. H., Shringi, S., Klein, T. A., Kim, H. C., Chong, S. T., Foley, J. (2008). Microbial pathogens in ticks, rodents and a shrew in northern Gyeonggi-do near the DMZ, Korea. *Journal of Veterinary Science*, *9*(3), 285-293.

Chan, K., Wang, C., Wu, Y. (2010). Serological survey of equine piroplasmosis, equine granulocytic anaplasmosis, and equine lyme disease in Taiwan. *Taiwan Veterinary Journal*, 36(4), 261-267.

Chastagner, A., Bailly, X., Leblond, A., Pradier, S., Vourc’h, G. (2013). Single genotype of *Anaplasma phagocytophilum* identified from ticks, Camargue, France. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(5), 825.

Chastagner, A., Dugat, T., Vourc’h, G., Verheyden, H., Legrand, L., Bachy, V., Leblond, A. (2014). Multilocus sequence analysis of *Anaplasma phagocytophilum* reveals three distinct lineages with different host ranges in clinically ill French cattle. *Veterinary Research*, *45*(1), 1-12.

Chatzis, M. K., Andreadou, M., Leontides, L., Kasabalis, D., Mylonakis, M., Koutinas, A. F., Saridomichelakis, M. N. (2014). Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. *Veterinary Parasitology*, *202*(3-4), 217-225.

Chen, S. M., Dumler, J. S., Bakken, J. S.,Walker, D. H. (1994). Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, *32*(3), 589-595.

Chmielewska-Badora, J., Zwolinski, J., Cisak, E., Wójcik-Fatla, A., Buczek, A.,Dutkiewicz, J. (2007). Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks determined by polymerase chain reaction with two pairs of primers detecting 16S rRNA and ankA genes. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *14*(2).

Christova, I., Schouls, L., van de Pol, I., Park, J., Panayotov, S., Lefterova, V., Dumler, J. S. (2001). High prevalence of granulocytic *Ehrlichiae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Bulgaria. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(11), 4172-4174.

Christova, I., Van De Pol, J., Velo, E.,Schouls, L. (2003). Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group Rickettsiae in ticks from Southeastern Europe. *European Journal of Clinical Microbiology And Infectious Diseases*, *22*(9), 535-542.

Christova, I., Van De Pol, J., Velo, E.,Schouls, L. (2003). Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group Rickettsiae in ticks from Southeastern Europe. *European Journal of Clinical Microbiology And Infectious Diseases,* *22*(9), 535-542.

Courtney, J. W., Dryden, R. L., Montgomery, J., Schneider, B. S., Smith, G.,Massung, R. F. (2003). Molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis* ticks from Pennsylvania. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(4), 1569-1573.

Çakmak A. (1990). Ankara Yöresinde Bir Sığır Sürüsünde Hemoparazitlerin İnsidensinin Araştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 37(3): 632-645.

Daniels, T. J., Boccia, T. M., Varde, S., Marcus, J., Le, J., Bucher, D. J., Schwartz, I. (1998). Geographic risk for Lyme disease and human granulocytic ehrlichiosis in southern New York State. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(12), 4663-4669.

Davies, R. S., Madigan, J. E., Hodzic, E., Borjesson, D. L.,Dumler, J. S. (2011). Dexamethasone-induced cytokine changes associated with diminished disease severity in horses infected with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clinical and Vaccine Immunology*, *18*(11), 1962-1968.

De La Fuente, J., Massung, R. F., Wong, S. J., Chu, F. K., Lutz, H., Meli, M., Kocan, K. M. (2005). Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(3), 1309-1317.

Dugat, T., Chastagner, A., Lagrée, A. C., Petit, E., Durand, B., Thierry, S., Haddad, N. (2014). A new multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals different clusters for *Anaplasma phagocytophilum* circulating in domestic and wild ruminants. *Parasitesvectors*, *7*(1), 1-11.

Dugat, T., Lagree, A. C., Maillard, R., Boulouis, H. J.,Haddad, N. (2015). Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Frontiers In Cellular and Infection Microbiology*, *5*, 61.

Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rurangirwa, F. R. (2001). 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *51*(6), 2145-2165.

DziĊgiel, B., Adaszek, L., Kalinowski, M., Winiarczyk, S. (2013) Equine granulocytic anaplasmosis, *Research in Veterinary Science*. 95, 316–320, http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc. 2013.05.010

Ebani, V., Cerri, D., Fratini, F., Ampola, M.,Andreani, E. (2008). Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic and wild animals from central Italy. *The New Microbiologica*, *31*(3), 371.

Engvall, E. O., Pettersson, B., Persson, M., Artursson, K.,Johansson, K. E. (1996). A 16S rRNA-based PCR assay for detection and identification of granulocytic *Ehrlichia* species in dogs, horses, and cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, *34*(9), 2170-2174.

Eriksen, L., Hansen, J. F., Abildtrup, E.,Engvall, E. O. (1997). Equine granulocytic ehrlichiosis diagnosed in Denmark. *Dansk Veterinaertidsskrift*.

Erlich, H. A., Gelfand, D.,Sninsky, J. J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, *252*(5013), 1643-1651.

Fang, Q. Q., Mixson, T. R., Hughes, M., Dunham, B.,Sapp, J. (2002). Prevalence of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in the coastal southeastern United States. *Journal of Medical Entomology*, *39*(2), 251-255.

Ferquel, E., Garnier, M., Marie, J., Bernede-Bauduin, C., Baranton, G., Pérez-Eid, C.,Postic, D. (2006). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Anaplasmataceae members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(4), 3074-3078.

Fingerle, V., Goodman, J. L., Johnson, R. C., Kurtti, T. J., Munderloh, U. G.,Wilske, B. (1999). Epidemiological aspects of human granulocytic Ehrlichiosis in southern Germany. *Wiener Klinische Wochenschrift*, *111*(22-23), 1000-1004.

Franzén, P., Aspan, A., Egenvall, A., Gunnarsson, A., Åberg, L.,Pringle, J. (2005). Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of Anaplasma phagocytophilum. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *19*(2), 232-239.

Franzén, P., Aspan, A., Egenvall, A., Gunnarsson, A., Karlstam, E.,Pringle, J. (2009). Molecular evidence for persistence of *Anaplasma phagocytophilum* in the absence of clinical abnormalities in horses after recovery from acute experimental infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *23*(3), 636-642.

Galke, D. (2009) Infektion mit *Anaplasma phagozytophilum* beim Hund: eine Studie über Prävalenz, Prävention, MunKlinik (Doctoral dissertation) Freie Universität Berlin.

Goodman, J. L., Nelson, C. M., Klein, M. B., Hayes, S. F.,Weston, B. W. (1999). Leukocyte infection by the granulocytic ehrlichiosis agent is linked to expression of a selectin ligand. *The Journal of Clinical Investigation*, *103*(3), 407-412.

Gordon, W. S., Brownlee, A., Wilson, D. R.,MacLeod, J. (1932). Tick-borne fever: a hitherto undescribed disease of sheep. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, *45*, 301-307.

Gotić, J., Brkljača Bottegaro, N., Kiš, I., Crnogaj, M., Mrljak, V.,Beck, R. (2017). A first case of equine granulocytic anaplasmosis in Croatia-a case report. *Veterinarski Arhiv*, *87*(1), 113-120.

Greig, B., Asanovich, K. M., Armstrong, P. J., Dumler, J. S. (1996). Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, *34*(1), 44-48.

Greig, B., Armstrong, P. J. (2006). Canine granulocytotropic anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, *3*, 219-224.

Gribble, D. H. (1969). Equine ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* 155, 462-469.

Grzeszczuk, A., Stańczak, J., Kubica-Biernat, B., Racewicz, M., Kruminis-Łozowska, W.,Prokopowicz, D. (2004). Human anaplasmosis in north-eastern Poland: seroprevalence in humans and prevalence in *Ixodes ricinus* ticks. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *11*(1), 99-103.

Grzeszczuk, A. (2006). *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and human granulocytic anaplasmosis seroprevalence among forestry rangers in Białystok region. *Advenced Medical Sciences*, *51*, 283-286.

Grzeszczuk, A., Stańczak, J. (2006). Highly variable year‐to‐year prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in northeastern Poland: A 4‐year follow‐up. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1078*(1), 309-311.

Günaydın, E., Pekkaya, S., Kuzugüden, F., Zeybek, M., Gökmen, T. G.,Ütük, A. E. (2018). The first detection of anti-*Anaplasma phagocytophilum* antibodies in horses in Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *24*(6).

Hackstadt, T., Baehr, W., Ying, Y. (1991). *Chlamydia trachomatis* developmentally regulated protein is homologous to eukaryotic histone H1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(9), 3937-3941.

Hansen, M. G., Christoffersen, M., Thuesen, L. R., Petersen, M. R., Bojesen, A. M. (2010). Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in Danish horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *52*(1), 1-6.

Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S. O., Hassler, D., Kimmig, P. (2004). Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (Ehrlichia sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *International Journal of Medical Microbiology Supplements*, *293*, 86-92.

Herron, M. J., Nelson, C. M., Larson, J., Snapp, K. R., Kansas, G. S.,Goodman, J. L. (2000). Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1. *Science*, *288*(5471), 1653-1656.

Hildebrandt, A., Schmidt, K. H., Wilske, B., Dorn, W., Straube, E.,Fingerle, V. (2003). Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *22*(6), 364-367.

Holden, K., Boothby, J. T., Anand, S.,Massung, R. F. (2003). Detection of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks (Acari: Ixodidae) from a coastal region of California. *Journal of Medical Entomology*, *40*(4), 534-539.

Hoşgör, M., Bilgiç, H. B., Bakırcı, S., Unlu, A. H., Karagenç, T., Eren, H. (2015). Aydın yöresinde sığırlarda ve kenelerde *Anaplasma/Ehrlichia* türlerinin belirlenmesi. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, *39*, 291-298.

Hudson, J. R. (1950). The recognition of tick-borne fever as a disease of cattle. *British Veterinary Journal*, *106*(1), 3-17.

Inci, A., Yildirim, A., Duzlu, O., Doganay, M.,Aksoy, S. (2016). Tick-borne diseases in Turkey: A review based on one health perspective. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *10*(12), e0005021.

Ismail, N., Bloch, K. C.,McBride, J. W. (2010). Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clinics in Laboratory Medicine*, *30*(1), 261-292.

Javed, K., Ijaz, M., Ali, M. M., Khan, I., Mehmood, K.,Ali, S. (2014). Prevalence and hematology of tick borne hemoparasitic diseases in equines in and around Lahore. *Pakistan Journal of Zoology*, *46*(2).

Jenkins, A., Kristiansen, B. E., Allum, A. G., Aakre, R. K., Strand, L., Kleveland, E. J., Schouls, L. (2001). *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in Ixodes ticks from southern Norway. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(10), 3666-3671.

Jiang, J. F., Jiang, B. G., Yu, J. H., Zhang, W. Y., Gao, H. W., Zhan, L., Cao, W. C. (2011). *Anaplasma phagocytophilum* infection in ticks, China–Russia border. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(5), 932. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1705.101630>.

Johansson, K. E., Pettersson, B., Uhlen, M., Gunnarsson, A., Malmqvist, M.,Olsson, E. (1995). Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16S rRNA gene. *Research in Veterinary Science*, *58*(2), 109-112.

Kara, M. (2012). Küresel Isınma ve Parazitler. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, *18*.

Karagenç, T., Hoşgör, M., Bilgiç, H., Paşa, S., Kırlı, G.,Eren, H. (2005). Ege Bölgesinde Köpeklerde *E. canis*, *A. phagocytophila* ve *A. platys*in prevalansının nested-PCR ile tespiti. In *Proceedings of the XIV National Parasitology Congress* (pp. 18-25).

Kim, H. Y., Mott, J., Zhi, N., Tajima, T.,Rikihisa, Y. (2002). Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in horses experimentally infected with *Anaplasma phagocytophila*. *Clinical and Vaccine Immunology*, *9*(5), 1079-1084.

Kim, C. M., Kim, M. S., Park, M. S., Park, J. H.,Chae, J. S. (2003). Identification of *Ehrlichia chaffeensis, Anaplasma phagocytophilum*, and *A. bovis* in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes persulcatus* ticks from Korea. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *3*(1), 17-26.

Korbutiak, E.,Schneiders, D. H. (1994). First confirmed case of equine ehrlichiosis in Great Britain. *Equine Veterinary Education*, *6*(6), 303-304.

Kramer, V. L., Randolph, M. P., Hui, L. T., Irwin, W. E., Gutierrez, A. G.,Vugia, D. J. (1999). Detection of the agents of human ehrlichioses in ixodid ticks from California. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *60*(1), 62-65.

Lappin, M. R. (2018). Update on flea and tick associated diseases of cats. *Veterinary Parasitology*, *254*, 26-29.

Layfield, D.,Guilfoile, P. (2002). The prevalence of *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) and the agent of human granulocytic ehrlichiosis (Rickettsiaceae: Ehrlichieae) in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) Collected During 1998 and 1999 from Minnesota. *Journal of Medical Entomology*, *39*(1), 218-220.

Leblond, A., Pradier, S., Pitel, P. H., Fortier, G., Boireau, P., Chadoeuf, J.,Sabatier, P. (2005). An epidemiological survey of equine anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*) in southern France. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, *24*(3), 899-908.

Lee, S. H., Kim, K. T., Yun, S. H., Choi, E., Lee, G. H., Park, Y. S., Kwak, D. (2015). Serological and molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in horses reared in Korea. *Veterinary Medicine*, *60*(10), 533-538.

Lee, S. H., Park, S. Y., Jang, M. J., Choi, K. J., Lee, H. K., Cho, Y. U., Do Hwang, S. (2017). Clinical isolation of *Anaplasma phagocytophilum* in South Korea. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *97*(6), 1686.

Leonhard, S. (2005). Untersuchungen zur Häufigkeit von *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* aus Bayern und Baden-Württemberg (Doctoral dissertation, lmunology).

Leutenegger, C. M., Pusterla, N., Mislin, C. N., Weber, R.,Lutz, H. (1999). Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the human granulocytic ehrlichiosis agent in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(10), 3390-3391.

Little, S. E. (2010). Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, *40*(6), 1121-1140.

Liz, J. S., Anderes, L., Sumner, J. W., Massung, R. F., Gern, L., Rutti, B.,Brossard, M. (2000). PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(3), 1002-1007.

M’ghirbi, Y., Yaïch, H., Ghorbel, A.,Bouattour, A. (2012). *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks in Tunisia. *Parasites Vectors*, *5*(1), 1-7.

Madigan, J. E. (1993). *Equine ehrlichiosis*. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 9(2), 423-428.

Madigan, J. E., Hietala, S., Chalmers, S.,DeRock, E. (1990). Seroepidemiologic survey of antibodies to *Ehrlichia equi* in horses of northern California. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *196*(12), 1962-1964.

Madigan, J. E., Richter Jr, P. J., Kimsey, R. B., Barlough, J. E., Bakken, J. S.,Dumler, J. S. (1995). Transmission and passage in horses of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Journal of Infectious Diseases*, *172*(4), 1141-1144.

Madigan, J. E.,Pusterla, N. (2000). Ehrlichial diseases. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, *16*(3), 487-499.

Madigan, J. (2021). *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia equi*) 50 years later. *Equine Veterinary Education*, *33*(3), 126-128.

Magnarelli, L. A., IJdo, J. W., Dumler, J. S., Heimer, R.,Fikrig, E. (1998). Reactivity of human sera to different strains of granulocytic ehrlichiae in immunodiagnostic assays. *The Journal of Infectious Diseases*, *178*(6), 1835-1838.

Mäkinen, J., Vuorinen, I., Oksi, J., Peltomaa, M., He, Q., Marjamäki, M.,Viljanen, M. K. (2003). Prevalence of granulocytic *Ehrlichia* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from Southwestern Finland and from Vormsi Island in Estonia. *Apmis*, *111*(2), 355-362.

Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L. M., Della Morte, R., Gravino, A. E. (2004). Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, *125*(3-4), 251-262.

Marques Dos Santos, T. M., Roier, E. C. R., Pires, M. S., Santos, H. A., Vilela, J. A. R., Peckle, M., Massard, C. L. (2019). Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Theileria equi* coinfection in horses from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary and Animal Science*, *7*, 100055.

Massung, R. F., Slater, K., Owens, J. H., Nicholson, W. L., Mather, T. N., Solberg, V. B.,Olson, J. G. (1998). Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*(4), 1090-1095.

Masuzawa, T., Kharitonenkov, I. G., Okamoto, Y., Fukui, T.,Ohashi, N. (2008). Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and its coinfection with *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks inhabiting Tver Province (Russia)–a sympatric region for both tick species. *Journal of Medical Microbiology*, *57*(8), 986-991.

Maurizi, L., Marié, J. L., Courtin, C., Gorsane, S., Chal, D., Davoust. B. (2009). Seroprevalence survey of equine anaplasmosis in France and in sub-Saharan Africa, *Clinical Microbiology Infections*, 15 (2), 68–69.

Mott, J.,Rikihisa, Y. (2000). Human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits superoxide anion generation by human neutrophils. *Infection and Immunity*, *68*(12), 6697-6703.

Munderloh, U. G., Blouin, E. F., Kocan, K. M., Ge, N. L., Edwards, W. L., Kurtti, T. J. (1996). Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. *Journal of Medical Entomology*, *33*(4), 656-664.

Munderloh, U. G., Tate, C. M., Lynch, M. J., Howerth, E. W., Kurtti, T. J.,Davidson, W. R. (2003). Isolation of an *Anaplasma* sp. organism from white-tailed deer by tick cell culture. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(9), 4328-4335.

Neer, T. M. (1998). Canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. Infectious Diseases of the Dog and Cat, 2nd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 139-147.

Ogden, N. H., Casey, A. N. J., Woldehiwet, Z.,French, N. P. (2003). Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* ticks from sheep in the acute and post-acute phases of infection. *Infection and Immunity*, *71*(4), 2071-2078.

Oğuz, B. (2021). First molecular detection and phylogenetic analysis of *Anaplasma phagocytophilum* in horses in Muş Province of Turkey. *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2021:7 (3) , 312-318. DOI: 10.30934/kusbed.895438.

Oteo, J. A., Gil, H., Barral, M., Pérez, A., Jimenez, S., Blanco, J. R., Juste, R. A. (2001). Presence of granulocytic *Ehrlichia* in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. *Epidemiology Infection*, *127*(2), 353-358.

Ozawa, Y., Kawamori, F., Masuda, T., Masuzawa, T., Fujita, H.,Ohashi, N. (2009). Structural analysis of a p44/msp2 expression site of *Anaplasma phagocytophilum* in naturally infected ticks in Japan. *Journal of Medical Microbiology*, *58*(12), 1638-1644.

Palomar, A. M., Portillo, A., Santibáñez, P., Mazuelas, D., Roncero, L., García‐Álvarez, L., Oteo, J. A. (2015). Detection of tick‐borne Anaplasma bovis, *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma centrale* in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, *29*(3), 349-353.

Park, J., Choi, K. S., Dumler, J. S. (2003). Major surface protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum* facilitates adherence to granulocytes. *Infection and İmmunity*, *71*(7), 4018-4025.

Parola, P., Raoult, D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases*, *32*(6), 897-928.

Passamonti, F., Fabrizia, V., Katia, C., Stefano, C., Giacomo, C., Luisa, M. M., Mauro, C. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks: a preliminary survey of Central Italy. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, *33*(1), 73-83.

Paşa, S., Kiral, F., Karagenc, T., Atasoy, A.,Seyrek, K. (2009). Description of dogs naturally infected with *Hepatozoon canis* in the Aegean region of Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *33*(4), 289-295.

Persichetti, M. F., Pennisi, M. G., Vullo, A., Masucci, M., Migliazzo, A.,Solano-Gallego, L. (2018). Clinical evaluation of outdoor cats exposed to ectoparasites and associated risk for vector-borne infections in southern Italy. *Parasites Vectors*, *11*(1), 1-11.

Petrovec, M., Sumner, J. W., Nicholson, W. L., Childs, J. E., Strle, F., Barlic, J., AvšičŽupanc, T. (1999). Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(1), 209-210.

Petrovec, M., Bidovec, A., Sumner, J. W., Nicholson, W. L., Childs, J. E., & Avsic-Zupanc, T. (2002). Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. *Wiener Klinische Wochenschrift*, *114*(13-14), 641-647.

Piccolin, G., Benedetti, G., Doglioni, C., Lorenzato, C., Mancuso, S., Papa, N., Bertiato, G. (2006). A study of the presence of *B. burgdorferi,* *Anaplasma* (previously *Ehrlichia*) *phagocytophilum,* *Rickettsia,* and *Babesia* in *Ixodes ricinus* collected within the territory of Belluno, Italy. *Vector-Borne Zoonotic Diseases*, *6*(1), 24-31.

Pichon, B., Kahl, O., Hammer, B.,Gray, J. S. (2006). Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. *Vector-Borne Zoonotic Diseases*, *6*(4), 382-387.

Plier, M. L., Young, K. M., Barlough, J. E., Madigan, J. E.,Dumler, J. S. (1999). Equine granulocytic ehrlichiosis: a case report with DNA analysis and species comparison. *Veterinary Clinical Pathology*, *28*(4), 127-130.

Polin, H., Hufnagl, P., Haunschmid, R., Gruber, F.,Ladurner, G. (2004). Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(5), 2285-2286.

Popov, V. L., Korenberg, E. I., Nefedova, V. V., Han, V. C., Wen, J. W., Kovalevskii, Y. V., Walker, D. H. (2007). Ultrastructural evidence of the ehrlichial developmental cycle in naturally infected *Ixodes persulcatus* ticks in the course of coinfection with Rickettsia, Borrelia, and a flavivirus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *7*(4), 699-716.

Prado, L. G., Palhares, M. S., Silveira, J. A. G. D., Ribeiro, Á. A. R., Miranda, A. L. S. D., Bezerra, V. M.,Ribeiro, M. F. B. (2018). *Anaplasma phagocytophilum* direct detection and exposure evidence in equines from two breeding farms from Minas Gerais State, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, *85*.

Praskova, I., Bezdekova, B., Zeman, P.,Jahn, P. (2011). Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in horses in the Czech Republic. *Ticks and Tick-borne Diseases*, *2*(2), 111-115.

Promega Corporation. (1999). Tools for analysis of population statistics. Profiles in DNA. Promega, 2, 14-16.

Pusterla, N., Huder, J. B., Feige, K.,Lutz, H. (1998). Identification of a granulocytic *Ehrlichia* strain isolated from a horse in Switzerland and comparison with other rickettsiae of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*(7), 2035-2037.

Pusterla, N., Huder, J. B., Leutenegger, C. M., Braun, U., Madigan, J. E.,Lutz, H. (1999). Quantitative real-time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup in host animals and *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(5), 1329-1331.

Rar, V. A., Epikhina, T. I., Livanova, N. N., Panov, V. V., Doroschenko, E. K., Pukhovskaya, N. M., Ivanov, L. I. (2011). Genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals in the Asian part of Russia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(8), 1013-1021.

Razzaq, F., Khosa, T., Ahmad, S., Hussain, M., Saeed, Z., Khan, M. A., Iqbal, F. (2015). Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in horses from Southern Punjab (Pakistan). *Tropical Biomedicine*, *32*(2), 233-239.

Reed, J., McNamee, C., Rackstraw, S., Jenkins, J.,Moss, D. (2004). Diglons are heterodimeric proteins composed of IgLON subunits, and Diglon-CO inhibits neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *Journal of Cell Science*, *117*(17), 3961-3973.

Rejmanek, D., Nieto, N. C., Barash, N.,Foley, J. E. (2011). Temporal patterns of tick-borne granulocytic anaplasmosis in California. *Ticks and Tick-borne Diseases*, *2*(2), 81-87.

Rikihisa, Y. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(5), 328-339.

Rikihisa, Y. (2011). Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(3), 469-489.

Rizzoli, A., Rosà, R., Mantelli, B., Pecchioli, E., Hauffe, H., Tagliapietra, V., Genchi, C. (2004). *Ixodes ricinus*, transmitted diseases and reservoirs. *Parassitologia*, *46*(1-2), 119-122.

Roellig, D. M.,Fang, Q. Q. (2012). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in ixodid ticks from equine-inhabited sites in the Southeasftern United States. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *12*(4), 330-332.

Rolim, M. F., Oliveira, F. C. R. D., Graça, F. A. S.,Brasil, F. D. C. (2015). Serological evidence of exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the Rio de Janeiro state mounted police bred in the urban zone. *Ciência Animal Brasileira*, *16*, 377-387.

Qurollo, B. (2019). Feline vector-borne diseases in North America. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, *49*(4), 687-702.

Said, M. B., Belkahia, H., Héni, M. M., Bouattour, A., Ghorbel, A., Gharbi, M., Messadi, L. (2014). Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in well-maintained horses from Northern Tunisia. *Tropical Biomedicine*, *31*(3), 432-440.

Sainz, A., Roura, X., Miro, G., Estrada-Pena, A., Kohn, B., Harrus, S., Solano-Gallego, L., (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites and Vectors,* *8*, 75

Saleem, S., Ijaz, M., Farooqi, S. H., Ghaffar, A., Ali, A., Iqbal, K., Zhang, H. (2018). Equine granulocytic anaplasmosis 28 years later. *Microbial Pathogenesis*, *119*, 1-8.

Salvagni, C. A., Dagnone, A. S., Gomes, T. S., Mota, J. S., Andrade, G. M., Baldani, C. D., Machado, R. Z. (2010). Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *19*(3), 135-140.

Santino, I., Iori, A., Nicoletti, M., Valletta, S., Cimmino, C., Scoarughi, G. L., Del Piano, M. (2003). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomospecies and of the human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent in *Ixodes ricinus* ticks collected in the area of Monti Lepini, Italy. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, *16*(2), 105-108.

Santos, A. S., Santos-Silva, M. M., Almeida, V. C., Bacellar, F.,Dumler, J. S. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira island and Setubal district, mainland Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, *10*(9), 1643.

Sarih, M. H., M'Ghirbi, Y., Bouattour, A., Gern, L., Baranton, G.,Postic, D. (2005). Detection and identification of *Ehrlichia* spp. in ticks collected in Tunisia and Morocco. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(3), 1127-1132.

Scarpulla, M., Caristo, M. E., Macri, G.,Lillini, E. (2003). Equine ehrlichiosis in Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *990*(1), 259-263.

Schotthoefer, A. M., Meece, J. K., Ivacic, L. C., Bertz, P. D., Zhang, K., Weiler, T., Fritsche, T. R. (2013). Comparison of a real-time PCR method with serology and blood smear analysis for diagnosis of human anaplasmosis: importance of infection time course for optimal test utilization. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2147-2153.

Schouls, L. M., Van De Pol, I., Rijpkema, S. G.,Schot, C. S. (1999). Detection and identification of *Ehrlichia,* *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(7), 2215-2222.

Schulze, T. L., Jordan, R. A., Schulze, C. J., Mixson, T.,Papero, M. (2005). Relative encounter frequencies and prevalence of selected *Borrelia*, *Ehrlichia,* and *Anaplasma* infections in *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) ticks from central New Jersey. *Journal of Medical Entomology*, *42*(3), 450-456.

Schvartz, G., Epp, T., Burgess, H. J., Chilton, N. B., Pearl, D. L.,Lohmann, K. L. (2015). Seroprevalence of equine granulocytic anaplasmosis and lyme borreliosis in Canada as determined by a point-of-care enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *The Canadian Veterinary Journal*, *56*(6), 575.

Seo, M. G., Ouh, I. O., Choi, E., Kwon, O. D.,Kwak, D. (2018). Molecular detection and phylogenetic analysis of *Anaplasma phagocytophilum* in horses in Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, 2018:56(6), 559.

Severo, M. S., Stephens, K. D., Kotsyfakis, M., Pedra, J. H. (2012). *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive? *Future Microbiology*, *7*(6), 719-731.

Sevinç F., Birdane F. M., Derinbay O. (2006): Anaplasma marginale infections in dairy cattle: clinical disease with high seroprevalence. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 50, 467-470.

Silaghi, C., Gilles, J., Höhle, M., Fingerle, V., Just, F. T.,Pfister, K. (2008). *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, *14*(6), 972.

Skarphédinsson, S., Lyholm, B. F., Ljungberg, M., Søgaard, P., Kolmos, H. J.,Nielsen, L. P. (2007). Detection and identification of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia helvetica* in Danish *Ixodes ricinus* ticks. *Apmis*, *115*(3), 225-230.

Skotarczak, B., Rymaszewska, A., Wodecka, B.,Sawczuk, M. (2003). Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. *Journal of Parasitology*, *89*(1), 194-196.

Skotarczak, B., Rymaszewska, A., Wodecka, B., Sawczuk, M., Adamska, M., Maciejewska, A. (2006). PCR detection of granulocytic Anaplasma and Babesia in Ixodes ricinus ticks and birds in west-central Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *13*(1).

Slivinska, K., Víchová, B., Werszko, J., Szewczyk, T., Wróblewski, Z., Peťko, B., Karbowiak, G. (2016). Molecular surveillance of *Theileria equi* and *Anaplasma phagocytophilum* infections in horses from Ukraine, Poland and Slovakia. *Veterinary Parasitology*, *215*, 35-37.

Solano-Gallego, L., Hegarty, B., Espada, Y., Llull, J.,Breitschwerdt, E. (2006). Serological and molecular evidence of exposure to arthropod-borne organisms in cats from northeastern Spain. *Veterinary Microbiology*, *118*(3-4), 274-277.

Sréter, T., Sréter-Lancz, Z., Széll, Z.,Kálmán, D. (2004). *Anaplasma phagocytophilum*: an emerging tick-borne pathogen in Hungary and Central Eastern Europe. *Annals of Tropical Medicine Parasitology*, *98*(4), 401-405.

Stanczak, J., Racewicz, M., Kruminis-Lozowska, W.,Kubica-Biernat, B. (2002). Coinfection of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in northern Poland with the agents of *Lyme borreliosis* (LB) and human granulocytic ehrlichiosis (HGE). *International Journal of Medical Microbiology*, *291*, 198-201.

Stanczak, J., Gabre, R. M., Kruminis-Lozowska, W., Racewicz, M., Kubica-Biernat, B. (2004). *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *11*(1).

Stanczak, J., Grzeszczuk, A. (2006). Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* among forestry rangers in northern and northeastern Poland. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1078*(1), 89-91.

Stanek, G. (2005). Durch Zecken übertragbare Krankheitserreger in Mitteleuropa. *Wiener Klinische Wochenschrift*, *117*(11-12), 373-380.

Stannard, A. A., Gribble, D. H.,Smith, R. S. (1969). Equine ehrlichiosis: a disease with similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever. *The Veterinary Record*, *84*(6), 149-150.

Stedingk, L. V., Gürtelschmid, M., Hanson, H. S., Gustafson, R., Dotevall, L., Engvall, E. O.,Granström, M. (1997). The human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent in Swedish ticks. *Clinical Microbiology and Infection*, *3*(5), 573-574.

Stich, R. W., Schaefer, J. J., Bremer, W. G., Needham, G. R.,Jittapalapong, S. (2008). Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, Ehrlichia canis. *Veterinary Parasitology*, *158*(4), 256-273.

Streit, M. (1993). Zur Klinik, Hämatologie und Epidemiologie der Ehrlichiose (Weidefieber) beim Rind. *Dissertation*, Bern.

Suksawat, J., Pitulle, C., Arraga-Alvarado, C., Madrigal, K., Hancock, S. I.,Breitschwerdt, E. B. (2001). Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(1), 90-93.

Teglas, M., Matern, E., Lein, S., Foley, P., Mahan, S. M.,Foley, J. (2005). Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. *Veterinary Parasitology*, *131*(1-2), 119-127.

Telford, S. R., Dawson, J. E., Katavolos, P., Warner, C. K., Kolbert, C. P.,Persing, D. H. (1996). Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(12), 6209-6214.

Tomanović, S., Chochlakis, D., Radulović, Ž., Milutinović, M., Ćakić, S., Mihaljica, D., Psaroulaki, A. (2013). Analysis of pathogen co-occurrence in host-seeking adult hard ticks from Serbia. *Experimental and Applied Acarology*, *59*(3), 367-376.

Tomasiewicz, K., Modrzewska, R., Buczek, A., Stańczak, J.,Maciukajć, J. (2004). The risk of exposure to *Anaplasma phagocytophilum* infection in Mid-EasternPoland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *11*(2), 261.

Torina, A., Alongi, A., Naranjo, V., Estrada-Peña, A., Vicente, J., Scimeca, S., de la Fuente, J. (2008). Prevalence and genotypes of *Anaplasma* species and habitat suitability for ticks in a Mediterranean ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(24), 7578-7584.

Torina, A., Alongi, A., Naranjo, V., Scimeca, S., Nicosia, S., Di Marco, V., De La Fuente, J. (2008). Characterization of *Anaplasma* infections in Sicily, Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149(1), 90-93.

Troese, M. J.,Carlyon, J. A. (2009). *Anaplasma phagocytophilum* dense-cored organisms mediate cellular adherence through recognition of human P-selectin glycoprotein ligand 1. *Infection and Immunity*, *77*(9), 4018-4027.

Ural, K., Gultekin, M., Atasoy, A.,Ulutas, B. (2014). Spatial distribution of vector borne disease agents in dogs in Aegean region, Turkey. *Revista MVZ Córdoba*, *19*(2), 4086-4098.

Urbani, L., Tirolo, A., Salvatore, D., Tumbarello, M., Segatore, S., Battilani, M., Dondi, F. (2020). Serological, molecular and clinicopathological findings associated with *Leishmania infantum* infection in cats in Northern Italy. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *22*(10), 935-943.

Varde, S., Beckley, J.,Schwartz, I. (1998). Prevalence of tick-borne pathogens in *Ixodes scapularis* in a rural New Jersey County. *Emerging Infectious Diseases*, *4*(1), 97.

Veronesi, F., Passamonti, F., Moretti, A., Morganti, G., Vardi, D. M., Laus, F., Piergili Fioretti, D. (2014). Evaluation of the performance of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of *Anaplasma phagocytophilum* antibodies in horses. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *14*(5), 317-323.

Von Loewenich, F. D., Bogdan, C. (2001). Die „unbekannte“ Zeckenerkrankung Ehrlichiose *Der Hausarzt* 10: 39-41

Von Loewenich, F. D., Baumgarten, B. U., Schröppel, K., Geißdörfer, W., Röllinghoff, M., Bogdan, C. (2003). High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(11), 5033-5040.

Wang, T., Malawista, S. E., Pal, U., Grey, M., Meek, J., Akkoyunlu, M., Fikrig, E. (2002). Superoxide anion production during *Anaplasma phagocytophila* infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *186*(2), 274-280.

Webster, P., IJdo, J. W., Chicoine, L. M.,Fikrig, E. (1998). The agent of human granulocytic ehrlichiosis resides in an endosomal compartment. *The Journal of Clinical Investigation*, *101*(9), 1932-1941.

Woldehiwet, Z. (1983). Tick-borne fever: a review *Veterinary Research Communications*. *6*, 163–175.

Woldehiwet, Z. (2010). The natural history of *Anaplasma phagocytophilum.* *Veterinary Parasitology*, *167*(2-4), 108-122.

Ybanez, A. P., Matsumoto, K., Kishimoto, T., Yokoyama, N., Inokuma, H. (2012). Dual presence of *Anaplasma phagocytophilum* and its closely related *Anaplasma* sp. in ixodid ticks in Hokkaido, Japan, and their specific molecular detection. *Journal of Veterinary Medical Science*, 12-0197.

Ybañez, A. P., Sivakumar, T., Ybañez, R. H. D., Vincoy, M. R. B., Tingson, J. A., Perez, Z. O., Yokoyama, N. (2013). Molecular survey of bovine vector-borne pathogens in Cebu, Philippines. *Veterinary Parasitology*, 196(1-2), 13-20.

Yoshiie, K., Kim, H. Y., Mott, J.,Rikihisa, Y. (2000). Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis. *Infection and Immunity*, *68*(3), 1125-1133.

**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Ege Bölgesi’ndeki atlarda *Anaplasma phagocytophilum* varlığının araştırılması” başlıklı Yüksek Lisans tezimdeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Hasan TOKER

… / … / …

# ÖZ GEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : TOKER, Hasan

**Uyruk** : Türkiye Cumhuriyeti

**Doğum yeri ve tarihi** : 23.10.1987

**E-mail** : tokerisg@gmail.com

**Yabancı Dil** : İngilizce

**EĞİTİM**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Derece** | **Kurum** | **Mezuniyet tarihi** |
| Lisans | Muğla Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü | 07.09.2011 |

**İŞ DENEYİMİ**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Yıl** | **Yer/Kurum** | **Ünvan** |
| 2012 | Finansbak A.Ş. | Direk Satış Tems. |
| 2014 | Efeler Belediyesi | Biyolog |
| 2016 | Aydın Büyükşehir Belediyesi | Biyolog |
| 2019 | Efeler Belediyesi | İş Güvenliği Uzmanı |
| 2021 | 4 Mevsim İlaçlama | Mesul Müdür |
|  |  |  |