

Diyarbakır Yöresinde Sığırlarda *Theileria annulata* ve *T. buffeli*'nin Multiplex PCR ile Saptanması

Ahmet DENİZ * Taraneh ÖNCEL **  Hasan İÇEN *** Aynur ŞİMŞEK ***

* Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Parazitoloji Laboratuvarı, TR-06020 Etlük, Ankara - TÜRKİYE

** Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Parazitoloji Laboratuvarı, TR-34890 Pendik, İstanbul - TÜRKİYE

*** Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, TR-21280 Diyarbakır - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2011-6073

Özet

Bu çalışmada Diyarbakır yöresinde sağlıklı görünümlü sığırlarda theileriosis'e neden olan etkenlerden *Theileria annulata* ve *T. buffeli*'nin varlığının eş zamanlı olarak multiplex PCR yöntemi ile tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Diyarbakır yöresinde toplam 100 sığırdan EDTA'lı tüplere tam kan alınmıştır. Aynı zamanda bu sığırların kene kontrolleri yapılarak perifer kan frotileri hazırlanmış ve mikroskopik olarak incelenmiştir. Multiplex PCR metodu ile 23 sığırdan *T. annulata* ve 1 sığırdan *T. annulata* + *T. buffeli* saptanmıştır. Mikroskopik incelemede ise 5 sığırdan *Theileria* spp. piroplazmalarına rastlanmıştır. Elde edilen bulgulara göre Diyarbakır bölgesinde *T. annulata*'nın yaygın olduğu görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Multiplex PCR, Sığır, Theileriosis

Detection of *Theileria annulata* and *T. buffeli* in Cattle by Multiplex PCR in Diyarbakir Area

Summary

The aim of this study was to detect *Theileria annulata* and *T. buffeli* in healthy cattle by multiplex PCR method in Diyarbakir area of Turkey. For this purpose a total of 100 blood samples were collected within the tubes coated with EDTA from cattle in Diyarbakir area. At the same time, peripheral blood smears were also prepared from each animal for microscopic examination. Additionally, the cattle were also examined for tick infestation. Tick infestation was not observed on the examined cattle. In microscopic examination of the blood smears, 5 of the 100 cattle were detected as positive for *Theileria* spp. In molecular analyses of the blood samples, *T. annulata* was detected in 23 cattle by multiplex PCR. In one cattle, *T. annulata* + *T. buffeli* was also determined via multiplex PCR. Results indicated that, *T. annulata* is commonly observed in cattle in Diyarbakir.

Keywords: Multiplex PCR, Cattle, Theileriosis

GİRİŞ

Theileriosis, hayvanlarda *Theileria* türlerinin sebep olduğu *Ixodidae* ailesine bağlı vektör keneler ile nakledilen bir protozoon enfeksiyonudur. Türkiye'de sığırlarda *Theileria annulata* ve *Theileria buffeli* türlerinin varlığı tespit edilmiştir. Tropikal theileriosisin etkeni olan *Theileria annulata*'nın morbidite ve mortalitesi yüksek olduğu için sığır yetiştiriciliğini tehdit etmekte ve büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. *Theileria buffeli*'nin ise daha az patojen olduğu bilinmektedir ¹⁻⁴.

Türkiye'de theileriosis ile ilgili araştırmalar, konvansi-

yonel olarak mikroskopik ve serolojik yöntemlerle yapılmıştır ⁵⁻⁹. Ancak mikroskopik bakı ile çeşitli *Theileria* türleri arasındaki ayırımı yapmak neredeyse imkansızdır. Bununla beraber dolaşımdaki antikorları ortaya koymak amacıyla İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) gibi serolojik testlerde de çapraz reaksiyonların görülmesi kesin teşhisi tartışmalı hale getirmektedir ¹⁰. Son yıllarda moleküler teşhis yöntemlerinin gelişmesi ve kullanılmasıyla yeni bir döneme girilmiştir. Bu dönemde geliştirilen PCR tabanlı teşhis yöntemleri theileriosisin teşhisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu kapsamda çeşitli PCR uygulamaları,



İletişim (Correspondence)



+90 216 3901280/181



taranehoncel@hotmail.com

Theileria annulata ve *Theileria buffeli*'nin teşhisinde de kullanılmıştır^{1,11-13}. PCR ile hibridizasyonun birlikte kullanıldığı RLB metodu birden fazla patojenin eş zamanlı teşhisinde olanak sağlamaktadır¹⁴⁻¹⁶. RLB ile yapılan teşhisin maliyeti oldukça yüksektir¹⁷.

Bu çalışmada multiplex PCR yöntemi kullanılarak Diyarbakır yöresinde sığırlarda *T. annulata* ve *T. buffeli*'nin varlığının eş zamanlı olarak saptanması ve yörede sığır theileriosis'inin epidemiyolojisine moleküler boyut kazandırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışma materyalini, Diyarbakır yöresine bağlı farklı odaklarda, değişik yaş ve cinsiyetlerde, theileriosis'e karşı aşılanmamış, merada otlatılan muhtemelen doğal kene enfestasyonlarına maruz kalmış ve sağlıklı görünümlü rastgele seçilen 100 melez sığırdan toplanan kan örnekleri oluşturmuştur. Her sığırdan tekniğine uygun şekilde, DNA ekstraksiyonu için EDTA'lı tüplere tam kan örneği alınmış ve protokol kayıtları yapılmıştır. Aynı zamanda bu sığırların perifer kan frotileri de hazırlanmış ve kene enfestasyonu varlığı yönünden kontrol edilmişlerdir. PCR için temin edilen EDTA'lı kan örnekleri DNA ekstraksiyonu yapıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Kan Frotilerin Mikroskopik Muayenesi

Sürme kan frotileri laboratuvarında metil alkol ile tespit edildikten sonra, %5'lik Giemsa solusyonu ile tekniğine uygun olarak boyanmıştır. İmmersiyon objektif altında (x100) incelenen 200 mikroskop sahasında en az bir piroplazmik formun görülmesi durumunda bile froti pozitif olarak kabul edilmiştir.

DNA Ekstraksiyonu ve Multiplex PCR

Tam kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu amacıyla QIAamp DNA blood kiti kullanılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan *Theileria annulata* DNA örneği Elazığ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden, *T. buffeli* ise Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden temin edilmiştir. Negatif kontrol olarak da *Theileria* türleri yönünden ari olduğu bilinen sığır kanlarından ekstrakte edilen DNA örneği kullanılmıştır. Multiplex PCR işlemi Altay ve ark.'nın² tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Testte kullanılan primerler ise *T. annulata* için Kirvar ve ark.¹⁸, *T. buffeli* için Tanaka ve ark.'nın¹⁹ çalışmalarından alınmıştır. *Theileria annulata*'nın

Tams 1 geni ve *T. buffeli*'nin MPSP geni amplifiye edilmiştir. Bu amaçla Tams1 F (5'-ATGCTGCAAATGAGGAT-3') ve Tspm1 R (5'-GGACTGATGAGAAGACGATGAG-3') ve Ts-U (5'-CACGCTATGTTGTCCAAGAG-3') ve Ts-R (5'-TG TGAGACTCAATGCGCCTA-3') primerleri kullanılmıştır. Her bir örnek, her primerden 20 pmol, Platinum Taq DNA Polymerase (5 U/µl) 1.25U, 10x PCR buffer 5 µl, MgCl (50 mM) 1.5 mM, dNTP mix 200 µM, 5 µl template DNA'sı içeren 50 µl'lik hacimlerde yapılmıştır. Reaksiyon şartları 94°C'de 5 dk ön denaturasyon, 94°C'de 1 dk, 60°C'de 1 dk ve 72°C'de 2 dk olmak üzere toplam 37 döngü olarak yapılmıştır. Son bir uzatma olarak 72°C'de 10 dk daha bekletilmiştir. Elde edilen reaksiyon ürünleri %1.8'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra ethidium bromide ile boyanıp, UV transilluminatörde bantların varlığı tespit edilmiştir.

BULGULAR

Diyarbakır yöresindeki 100 sağlıklı sığırdan elde edilen kan örneklerinin mikroskopik bakı ve multiplex PCR sonuçları **Tablo 1**'de verilmiştir. Multiplex PCR ile 100 sığırın 24'ü pozitif bulunmuştur. Pozitif bulunan 24 sığırın 23'ünde *T. annulata*, 1'inde *T. annulata* + *T. buffeli* (miks enfeksiyon) tespit edilmiştir. Multiplex PCR ile elde edilen ürünlerin ethidium bromide ile boyalı agaroz jel elektroforezde görünümü **Şekil 1**'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi multiplex PCR sonucunda *T. annulata* pozitif kontrol DNA ile Tams 1 geni ve *T. buffeli* pozitif kontrol DNA ile MPSP geni amplifiye edilmiştir.

Mikroskopik bakı ile 100 sığırın 5'inde *Theileria* spp. piroplazmalarına rastlanmıştır. Sığırların kene kontrolünde, enfestasyona tesadüf edilememiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

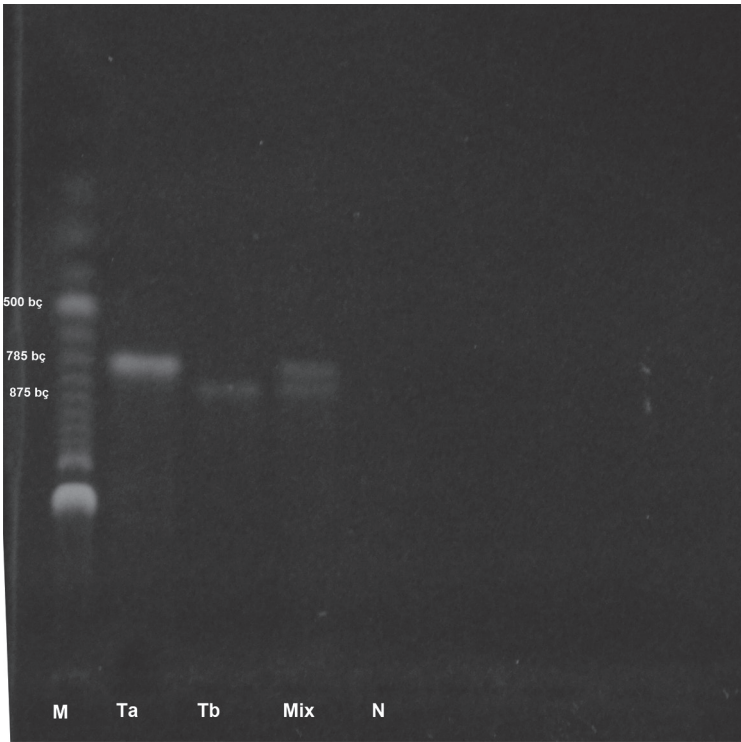
Türkiye'de tropikal theileriosisin sığırların en önemli hastalıklarından biri olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir.^{4,8,20,21} Hastalık son yıllarda özellikle kültür ırkı sığırlarda yüksek mortaliteye ve büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır²²⁻²⁵. İnci ve ark.²⁶ Nisan 1999-Kasım 2001 yılları arasında Kapadokya bölgesinde yaptıkları çalışmada tropikal theileriosis'e bağlı meydana gelen ekonomik kayıplarının 598.133 \$ olduğunu belirtmişlerdir. Hastalığa ait mikroskopik bakıya dayalı yapılan çalışmalarda, Orta Anadolu'da^{7,8} %17.87-%94.32, Karadeniz bölgesinde^{5,27} %17.44 -%32.8, Ege bölgesinde⁶ %43.2, Marmara bölge-

Tablo 1. *Theileriosis* yönünden incelenen sığırların mikroskopik bakı (MB) ve multiplex PCR sonuçları

Table 1. Results of cattle for the presence of theileriosis by microscopical examination (ME) and multiplex PCR

Yöntem	Hayvan Sayısı	<i>T. annulata</i>	<i>T. buffeli</i>	<i>T. annulata</i> + <i>T. buffeli</i>	Toplam
Multiplex PCR	100	23	0	1	24
MB *	100	5*	0	0	5

MB * mikroskopik bakı *Theileria* spp. düzeyinde teşhis edilmiştir



Şekil 1. Multiplex PCR ile elde edilen *Theileria* türlerinin ethidium bromide ile boyalı agaroz jel elektroforezde görünümü (M: 100 bp DNA Marker, Ta: *Theileria annulata*, Tb: *Theileria buffeli*, Mix: *T. annulata* + *T. buffeli*, N: Negatif kontrol)

Fig 1. Ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis of amplification products from *Theileria* species by multiplex PCR (M: 100 bp DNA Marker), Ta: *Theileria annulata*, Tb: *Theileria buffeli*, Mix: *T. Annulata* + *T. buffeli*, N: Negative control

sinde ⁹ %23.18, Kapadokya bölgesinde ²⁸ %60,5 oranlarında bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada Diyarbakır yöresinde mikroskopik bakıda sığırlarda theileriosis'in yaygınlığını %5 olarak tespit edilmiştir.

Türkiye'nin değişik bölgelerinde PCR ve RLB metotları ile *T. annulata* ve *T. buffeli* türlerinin ortaya konduğu çeşitli çalışmalar mevcuttur ^{1,13-16,21}. Türkiye'de PCR ile *T. annulata*'nın teşhisi ilk olarak Aktaş ve ark.¹¹ tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar Elazığ ve Malatya yörelerinden rastgele seçtikleri 110 sığırdan elde ettikleri örneklerde N516 ve N517 primerleri kullanarak tek aşamalı PCR testi yapmışlar ve %30.9 oranında pozitiflik tespit etmişlerdir. Vatansver ve Nalbantoğlu ¹³ Ankara ilinin Polatlı ilçesine bağlı 4 yerleşim bölgesinde 147 sığırdan elde ettikleri örneklerde, *T. annulata*'nın 30 kDa merozoit antijenini kodlayan primerlerle yaptıkları nested-PCR'da *T. annulata*'nın yaygınlığını %61.2 olarak bulmuşlardır. Deniz ve Karaer ¹⁵ Ankara bölgesinde RLB ile *Theileria* türlerinin prevalansını %47.6 (%34 *T. annulata*, %6.4 *T. buffeli*, %7.2 *T. annulata* + *T. buffeli*) olarak tespit etmişlerdir. Aktaş ve ark.¹ Doğu Anadolu bölgesindeki bazı illerde sığırlarda PCR ile *T. annulata*'nın %39.28, *T. buffeli*'nin %7.4 bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Bu çalışmalarda kullanılan PCR'in mikroskopik bakı ve IFAT'a göre portör hayvanların belirlenmesinde çok daha duyarlı ve özgül olduğu gösterilmiştir ¹³⁻¹⁵. Bu çalışmada multiplex PCR yöntemi ile *Theileria* türlerinin yaygınlığı %24 (%23 *T. annulata*, %1 *T. annulata* + *T. buffeli*) olarak tespit edilmiş ve sığırlarda *Theileria* enfeksiyonlarının belirlenmesinde multiplex PCR'in mikroskopik bakıdan daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Türkiye'de hastalığın epidemiyolojisi üzerine yapı-

lan çalışmalarda, farklı bölgelerde theileriosis bakımından enzootik stabilitenin varlığı rapor edilmiştir ^{20-22,29,30}. Theileriosis'e bağlı ekonomik kayıpların üretim kaybı, kontrol için yapılan harcamalar ve indirekt ekonomik kayıplardan kaynaklandığı belirtilmiştir ²⁶. Bu çalışmada Diyarbakır yöresinde multiplex PCR yöntemi ile theileriosis'in yaygınlığı araştırılmıştır. Bu bölgede hastalığa bağlı ekonomik kayıpların ve bölgenin stabilize ve instabilitesinin ortaya koyulabilmesi için detaylı epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Altay ve ark.² multiplex PCR ile *T. annulata* ve *T. buffeli*'nin eş zamanlı olarak teşhisinin mümkün olduğu ve özellikle epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilirliğini bildirmişlerdir. Bişkin ve ark.³¹ multiplex PCR ile kısa zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonunun gerçekleştirildiğinden dolayı kullanışlı bir inceleme yöntemi olduğunu belirtmişlerdir. Multiplex PCR yöntemi ile *T. annulata* ve *T. buffeli*'den ileri gelen tek veya mix enfeksiyonlarının ortaya konulabileceği, bu çalışmada elde edilen sonuçlarla da doğrulanmış ve güvenli bir yöntem olarak kullanılabilirliği kanısına varılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmayla Diyarbakır yöresinde sığırlarda multiplex PCR metodu ile *T. annulata* ve *T. buffeli* türlerinin varlığı saptanmış ve yörede sığır theileriosis'inin epidemiyolojisine moleküler bir derinlik sağlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Prof. Dr. Münir AKTAŞ ve Prof. Dr. Zati VATANSEVER'e gönderdikleri pozitif *Theileria annulata* ve *Theileria buffeli* kontrol DNA örnekleri için teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Aktas M, Altay K, Dumanlı N: A molecular survey of bovine *Theileria* parasites among apparently healthy cattle and with a note on the distribution of ticks in eastern Turkey. *Vet Parasitol*, 138, 179-185, 2006.
2. Altay K, Aydın MF, Uluşık U, Aktas M, Dumanlı N: *Theileria annulata* ve *Theileria buffeli*'nin teşhisinde Multiplex PCR'ın kullanılması. *T Parazitol Derg*, 32, 1-3, 2008.
3. İca A, İnci A, Yıldırım A: Parasitological and molecular prevalence of bovine *Theileria* and *Babesia* species in the vicinity of Kayseri. *Turk J Vet Anim Sci*, 31, 33-38, 2007.
4. Altay K, Aktaş M: Sığır Theileriosisi. *Fırat Univ Sağlık Bil Derg*, 18, 79-86, 2004.
5. Açııcı M: Samsun ve yöresi sığırlarında kan parazitlerinin yayılışı. *Etilik Vet Microb Enst Derg*, 8, 271-277, 1995.
6. Erkut HM: Ege bölgesinde sığırlarında Piroplasmosis durumu ve tedavide yeni ilaçlamalar. *Bornova Vet Araş Enst Derg*, 8, 120-130, 1967.
7. Göksu K: Ankara ve civarı sığırlarda theileriosis üzerinde sistematik araştırmalar. *Tez*, Ankara Üniv. Vet. Fak. Yay., No: 115/60, Yeni Matbaa, Ankara, 73s, 1959.
8. Özcan C: Ankara civarında evcil hayvanlarda Piroplasmose vakaları ve tedavileri üzerine araştırmalar. *Doçentlik Tezi*, Ankara Üniv. Vet. Fak. Yay., 143, 83, 1961.
9. Tüzer E: İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda görülen *Babesia*, *Theileria* ve *Anaplasma* türleri ve bunlardan oluşan enfeksiyonların yayılışı üzerine araştırma. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg*, 8, 97-110, 1982.
10. Pipano E, Cahana M: Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Theileria annulata*. *J Parasito*, 55, 765, 1969.
11. Aktas M, Dumanlı N, Cetinkaya B, Çakmak A: Field evaluation of PCR in Detecting *Theileria annulata* infection in cattle in eastern Turkey. *Vet Rec*, 150, 548-549, 2002.
12. Hoghooghi- Rad N, Ghaemi P, Shayan P, Eckert B, Sadr-Shirazi N: Detection of native carrier cattle infected with *Theileria annulata* by Semi-Nested PCR and Smear Method in Golestan province of Iran. *World Appl Sci J*, 12, 317-323, 2011.
13. Vatanserver Z, Nalbantoğlu S: Sahada *Theileria annulata* ile enfekte sığırların Nested PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), IFA (İndirekt Floresan Antikor) testi ve kan frotisi bakısı ile saptanması. *Turk J Vet Anim Sci*, 26, 1465-1469, 2002.
14. Altay K, Aktaş M, Dumanlı N: Erzincan yöresinde sığırlarda *Theileria annulata* ve *Theileria buffeli/orientalis*'in Reverse Line Blotting Yöntemi ile Araştırılması. *T Parazitol Derg*, 31, 94-97, 2007.
15. Deniz A, Karaer Z: Sığırlarda *Theileria* türlerinin Reverse Line Blotting ve İndirekt Floresan Antikor Testi ile karşılaştırmalı tanısı üzerine araştırmalar. *Etilik Vet Mikrob Enst Derg*, 17, 43-54, 2006.
16. Vatanserver Z, İca A, Deniz A, Nalbantoğlu S, Karaer Z, Çakmak A, Sparagano O: Ankara Yöresinde kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının Reverse Line Blotting (RLB) ve İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) ile saptanması. *XIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Konya*. s. 194, 2003.
17. Sparagano O, Loria GR, Gubbels MJ, De Vos AP, Caracappa S, Jongejan F: Integrated molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species of cattle in Italy. *Ann NY Acad Sci*, 916, 533-539, 2000.
18. Kirvar E, İlhan T, Katzer F, Hooshmand-Rad P, Zweygarth E, Gerstenberg C, Phipps P, Brown CGD: Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences. *Parasitology*, 120, 245-254, 2000.
19. Tanaka M, Onoe S, Matsuba T, Katayama S, Yamanaka M, Yonemichi H, Hiramatsu K, Baek BK, Sugimoto C, Onuma M: Detection of *Theileria sergenti* infection in cattle by polymerase chain reaction amplification of parasite-specific DNA. *J Clin Microbiol*, 31, 2565-2569, 1993.
20. Dumanlı N, Aktas M, Cetinkaya B, Çakmak A, Koroglu E, Saki CE, Erdogmus Z, Nalbantoglu S, Ongor H, Simsek S, Karahan M, Altay K: Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey. *Vet Parasitol*, 127, 9-15, 2005.
21. İnci A, Karaer Z, Çakmak A, Günay O, Atasever A, Nalbantoğlu S, Vatanserver Z, Çam Y, İca A, Yıldırım A: Kayseri Yöresinde sığırlarda tropikal theileriosisin epidemiyoloji üzerine araştırmalar. Kayseri. DPT 98-K12139 nolu projenin final raporu. 2003.
22. İnci A, Çakmak A, Çam Y, Karaer Z, Atasever A, İca A: Kayseri yöresinde Tropikal Theileriosis'e bağlı ekonomik kayıplar. *T Parazitol Derg*, 26, 156-160, 2002.
23. Başbuğ O, Gül Y: Tropikal Tayleriyozisli sığırlarda hemoliz üzerine araştırmalar. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 421-427, 2011.
24. İssi M, Gül Y, Başbuğ O, Şahin N: Tropikal theileriosisli sığırlarda klinik, hematolojik ve bazı biyokimyasal parametreler ile serum kobalt ve B₁₂ vitamin düzeyleri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 909-913, 2010.
25. Çiçek H, Çiçek H, Eser M, Tandoğan M: Current status of ruminant theileriosis and its economical impact in Turkey. *T Parazitol Derg*, 33, 273-279, 2009.
26. İnci A, İca A, Yıldırım A, Vatanserver Z, Çakmak A, Albasan H, Cam Y, Atasever A, Sariozkan S, Duzlu O: Economical impact of tropical theileriosis in the Cappadocia region of Turkey. *Parasitol Res*, 101 (Suppl 2), 171-174, 2007.
27. Dinçer Ş, Sayın F, Karaer Z, Çakmak A, Friedhoff KT, Müller I, İnci A, Yukarı BA, Eren H: Karadeniz bölgesi sığırlarında bulunan kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 38, 206-226, 1991.
28. İnci A, İca A, Yıldırım A, Vatanserver Z, Çakmak A, Albasan H, Çam Y, Atasever A, Düzlü Ö: Epidemiology of tropical theileriosis in the Cappadocia region. *Turk J Vet Anim Sci*, 32, 57-64, 2008.
29. Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H, Vatanserver Z, Nalbantoğlu S: Studies on the epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in cattle in Central Anatolia, Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 35, 521-539, 2003.
30. Ayerdem B, İnci A, Uyanık F, İca A, Çakmak A, Yıldırım A: Sığırlarda doğal *Theileria annulata* enfeksiyonlarında monosit nitrik oksit düzeyleri. *ERÜ Sağlık Bil Derg (J Health Sci)*, 15, 116-121, 2006.
31. Bişkin Z, Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö: Parazitolojide teşhis amaçlı kullanılan moleküler biyolojik teknikler. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 8, 43-51, 2011.