T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

BABESIA BIGEMINA KAYSERİ/TÜRKİYE SUŞLARININ APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 (AMA-1) PROTEİNİNİN MOLEKÜLER GENOTİPLENDİRİLMESİ, EKSPRESYONU VE İMMUNOLOJİK KARAKTERİZASYONU

Hazırlayan
Araş. Gör. Arif ÇİLOĞLU

Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Doktora Tezi

Eylül 2016
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

BABESIA BIGEMINA KAYSERİ/TÜRKİYE SUŞLARININ APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 (AMA-1) PROTEİNİNİN MOLEKÜLER GENOTİPLENDİRİLMESİ, EKSPRESYONU VE İMMUNOLOJİK KARAKTERİZASYONU

Hazırlayan
Araş. Gör. Arif ÇİLOĞLU

Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ

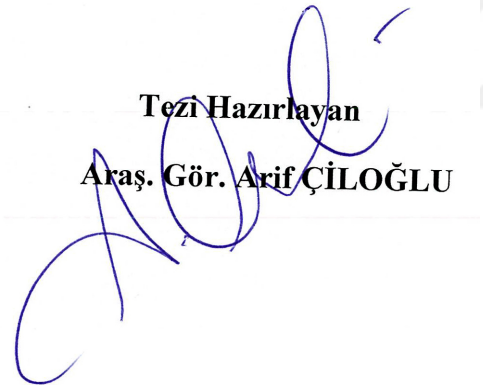
Doktora Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2014-5030 nolu proje ile desteklenmiştir.

Eylül 2016
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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



Tezi Hazırlayan

Araş. Gör. Arif ÇİLOĞLU

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"***Babesia bigemina*** **Kayseri/Türkiye Suşlarının Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) Proteininin Moleküler Genotiplendirilmesi, Ekspresyonu ve İmmunolojik Karakterizasyonu**", Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Araş. Gör. Arif ÇİLOĞLU

Danışman

Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Prof. Dr. Abdullah İNCİ danışmanlığında **Araş. Gör. Arif ÇİLOĞLU** tarafından hazırlanan "***Babesia bigemina* Kayseri/Türkiye Suşlarının Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) Proteininin Moleküler Genotiplendirilmesi, Ekspresyonu ve İmmunolojik Karakterizasyonu**" konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Parazitoloji** Anabilim Dalı'nda **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

22/09/2016

JÜRİ :

İmza

Danışman : Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Üye: Prof. Dr. Münir AKTAŞ

Üye: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

Üye: Doç. Dr. G. Zafer PEKMEZCİ

Üye : Doç. Dr. Önder DÜZLÜ

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……..tarih ve……..sayılı kararı ile onaylanmıştır.

……/…./…….

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin bütün periyotlarında yüksek disiplin temelinde eğitim ve öğretimime büyük bir titizlik gösteren ve yön veren, başta tez konusunun seçilmesi olmak üzere çalışmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik gelişmeme katkıda bulunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdullah İNCİ'ye en içten duygularımla teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca yüksek akademik ve bilimsel bilgi birikimini, evrensel paylaşım anlayışı çerçevesinde benimle paylaşan ve laboratuvar analizleri sırasında bizzat desteklerini gördüğüm özverili ve hoşgörülü ikinci tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM'a bu sınırsız desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Parazitoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve her zaman destekteklerini ve yakın ilgilerinin gördüğüm kıymetli hocalarım Doç. Dr. Önder DÜZLÜ ile Yrd. Doç. Dr. Zuhal ÖNDER'e tez çalışmama TDK-2014-5030 kodlu proje ile destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Bu günlere ulaşmamı sağlayan sevgili aileme ve tez çalışmalarım sırasında desteklerini gördüğüm sevgili arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

BABESIA BIGEMINA KAYSERİ/TÜRKİYE SUŞLARININ APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 (AMA-1) PROTEİNİNİN MOLEKÜLER GENOTİPLENDİRİLMESİ, EKSPRESYONU VE İMMUNOLOJİK KARAKTERİZASYONU

Arif ÇİLOĞLU
Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Eylül 2016
Danışman: Prof. Dr. Abdullah İNCİ

ÖZET

Bu çalışma, *in vivo* ve *in vitro* kültivasyonu yapılmış ve pasajlanmış (*in vivo*: 1. pasaj; *in vitro*: 1. pasaj) olan "*Babesia bigemina* Kayseri/Türkiye" suşlarının AMA-1 proteinlerinin moleküler genotiplendirilmesi, ekspresyonu ile immunolojik karakterizasyonunu belirlemek, söz konusu proteinin attenüasyona bağlı poliformizm gösterip göstermediğini ortaya koymak ve yeni aşıların geliştirilmesinde hedef protein olarak güvenilirliğini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, %4,1 ve %11 parazitemiye sahip suşlardan; AMA-1 gen bölgesini kodlayan nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi, belirlenen nükleotid dizilimlerinin intron içerip içermediğinin tespiti ve elde edilen sekansların ekspresyon analizleri öncesinde açık okuma çerçevesi [open reading frame (ORF)] veri tabanında değerlendirilmesi amacıyla genomik DNA (gDNA) izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen gDNA izolatları, *B. bigemina* AMA-1 (BbigAMA-1) geninin tamamını amplifiye eden spesifik primerler ile PCR analizine tabii tutulmuştur. PCR sonrasında BbigAMA-1 geni pJET1.2/blunt vektörüne klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmidler sekanslanarak GenBank'a kaydedilmiş (KP000032-33) ve Dünyadaki diğer BbigAMA-1 izolatları ile çoklu ve ikili hizalamaları yapılarak filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon analizleri öncesinde elde edilen nükleotid ve amino asit dizileri ORF veri tabanında değerlendirilmiş ve ekspresyon analizleri için yeni primerler dizayn edilmiştir. Daha sonra, aynı suşlar ekspresyon analizleri için RNA ekstraksiyonuna tabii tutulmuş ve takiben revers transkripsiyon ile cDNA sentezi yapılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar, BbigAMA-1 fragmentleri için dizayn edilen primerler ile tekrar PCR analizine tabii tutulmuş ve sonrasında elde edilen ürünler ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Klonlama sonrasında rekombinant plazmidler *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine tranforme

edilmiş ve IPTG ile indüklenerek rekombinant BbigAMA-1 genlerinin ekspresyonu sağlanmıştır. Ekspresyon ürünlerinde hedef protein bandı SDS-PAGE ve Western Blot teknikleri ile analiz edilmiş ve BbigAMA-1'in her iki suş için de moleküler ağırlıkları hesaplanmıştır. Nükleotid dizilimlerinin çoklu ve ikili hizalamalar ile filogenetik analizler sonucu Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2 suşları kendi aralarında %99,77 identiklik gösterirken her iki suş en yüksek identikliği GenBank'a kayıtlı "Turkey" suşu (GenBank aksesyon no: JN572801) ile göstermiştir. Aynı izolatların amino asit dizilimlerinin ikili hizalamaları yapıldığında benzerlik oranı %99,83 olarak belirlenmiş ve elde edilen bu oranın, nükleotid sekans dizilimlerinin 103. nükleotidlerindeki mutasyondan ileri geldiği tespit edilmiştir. Bunun yanında, SDS-PAGE ve Western Blot analizleri ile söz konusu iki suşun 72 kDa moleküler ağırlıklarla farklı zaman dilimlerinde eksprese oldukları da belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler, AMA-1'in *B. bigemina* için uygun bir aşı adayı hedef protein olup olmadığı noktasında tartışmalı olduğunu ve hususun aydınlığa kavuşması için Türkiye'ye özgü çok sayıda homolog suşa ait BbigAMA-1 proteinin *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda immun reaksiyon denemelerine tabii tutulması gerektiğini göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile *B. bigemina*'nın iki farklı pasajında yer alan hedef AMA-1 proteinlerinin moleküler karakterizasyon ve ekspresiyonları karşılaştırmalı olarak ilk defa yapılmış ve iki suş arasında mutasyonel farklılıkları gösteren attenüasyona bağlı polimorfik alanlar tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *B. bigemina*, Babesiosis, Apical Membrane Antigen-1, Moleküler genotiplendirme, Ekspresyon, Filogenetik karakterizasyon

MOLECULAR GENOTYPING, EXPRESSION AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 (AMA-1) FROM *BABESIA BIGEMINA* KAYSERI/TURKEY STRAINS

Arif CILOGLU
Erciyes University, Graduate School of Health Science
Department of Veterinary Parasitology
PhD Thesis, September 2016
Supervisor: Prof. Dr. Abdullah INCI

ABSTRACT

This study was performed to genotyping, expression and immunogenic characterization of AMA-1 protein molecules of *in vivo* and *in vitro* cultivated and passaged (*in vivo*: 1st passage; *in vitro*: 1st passage) "*Babesia bigemina* Kayseri/Türkiye" strains, and also to detect the polymorphisms of these molecules depend on the attenuation of the strains. For this aim, total genomic DNAs were extracted from the *B. bigemina in vivo* and *in vitro* cultured strains which have 4.1% and 11% parasitemia, respectively in order to determinate the nucleotide sequences of AMA-1, research the intronless genes in the obtained sequences and analyzed the fragments in open reading frame (ORF). The PCR was carried out with specific AMA-1 primers which amplified full-length *B. bigemina* AMA-1 (BbigAMA-1) gene. The PCR products were purified and cloned into pJET1.2/blunt vector. The cloned isolates were sequenced and the obtained sequences were deposited in GenBank with accession numbers KP000032-33. Pairwise analyses of the sequences and multiple alignments with some other BbigAMA1 isolates available in GenBank were performed and phylogenies were investigated. The truncated open reading frames (ORF) of the BbigAMA-1 fragments were obtained and new primers were designed for expressions. Total RNAs were extracted from the same strains and the cDNAs were prepared from the obtained RNA samples. The obtained cDNAs were amplified by PCR using predesigned expression specific primers and cloned into the expression plasmid vectors. The plasmids were subsequently transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells and expressed with IPTG concentrations. The expressed samples were analyzed by using SDS-PAGE and Western Blot techniques and target protein weights were calculated. Pairwise alignment of the sequences from Kayseri/Turkey IV1 strain from in vivo passage 1 and Kayseri/Turkey IT2 strain from in vitro passage 1 of *B. bigemina* showed 99.77% identity to each other. According to the phylogenetic comparisons, Kayseri/Turkey IV1 strain and Kayseri/Turkey IT2 strains showed most

similarity to “Turkey” strain (GenBank accession no: JN572801). Moreover, the amino acid sequences of these two strains showed 99.83% identity to each other because of a mutation in 103rd nucleotides. BbigAMA-1 strains were expressed with a molecular mass of 72 kDa in different expression periods. Depend on the data obtained from this study, BbigAMA-1 was evaluated some controversial as target protein for vaccine candidate to developing immunization against *B. bigemina* infections in cattle. Because of, this protein should be tested with both of *in vitro* and *in vivo* experimental immunoreactions using homolog local *B. bigemina* strains in all regions of Turkey.

In conclusion, molecular characterization and expression level of target AMA-1 protein found in the two different passages of *B. bigemina* were comparatively and firstly determined with this study and polymorphic regions were revealed due to the attenuation which showed mutational differences between these two strains.

Key words: *B. bigemina*, Babesiosis, Apical Membrane Antigen-1, Molecular genotyping, Expression, Phylogenetic characterization

İÇİNDEKİLER

BABESIA BIGEMINA KAYSERİ/TÜRKİYE SUŞLARININ APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 (AMA-1) PROTEİNİNİN MOLEKÜLER GENOTİPLENDİRİLMESİ, EKSPRESYONU VE İMMUNOLOJİK KARAKTERİZASYONU

Sayfa

İÇ KAPAK i

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ii

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI iii

TEŞEKKÜR v

ÖZET vi

ABSTRACT viii

İÇİNDEKİLER x

TABLOLAR LİSTESİ xiv

ŞEKİLLER LİSTESİ xv

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. BABESİOSİS'İN TANIMI VE TARİHÇESİ 3

2.2. *BABESIA* TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ 5

2.3. SIĞIRLARDAKİ *BABESIA* TÜRLERİNİN GENEL MORFOLOJİLERİ 7

2.4. *BABESIA* TÜRLERİNİN HAYAT SİKLUSU ve GELİŞME ŞEKİLLERİ 9

2.4.1. Omurgalı Konakta Gelişme 9

2.4.2. Vektör Kenede Gelişim 11

2.5. BABESİOSİS'İN EPİDEMİYOLOJİSİ VE YAYILIŞI 13

2.5.1. Sığır Babesiosisi'nin Dünya'daki Yayılışı 15

2.5.2. Sığır Babesiosisi'nin Türkiye'deki Yayılışı 15
2.6. BABESİOSİS'İN KLİNİK BELİRTİLERİ 21
2.7. BABESİOSİS'İN PATOGENEZİ 23
2.8. BABESİOSİS'TE BAĞIŞIKLIK 24
2.8.1. Doğal Bağışıklık 27
2.8.2. Kazanılmış Bağışıklık 29
2.9. BABESİOSİS'TE TEŞHİS 31
2.9.1. Mikroskobik Teşhis 31
2.9.2. Serolojik Teşhis 32
2.9.3. Moleküler Teşhis 33
2.10. BABESİOSİS'İN TEDAVİSİ 37
2.11. BABESİOSİS'DEN KORUNMA VE KONTROL 40
2.11.1. Vektör Kenelerle Mücadele ve Kene Kontrolü 40
2.11.2. Preimmunizasyon 40
2.11.3. Aşılama 42
2.12. *BABESIA* TÜRLERİNİN ANTİJENİK YAPILARI VE APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 (AMA-1) 44
2.12.1. Eritrositlere Giriş Mekanizması ve Antijenleri 44
2.12.2. Antijenik Varyasyonlar 44
2.12.3. Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) 47
3. GEREÇ VE YÖNTEM 56
3.1. GENOMİK DNA İZOLASYONU 56
3.2. APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 (AMA-1)'İ KODLAYAN GEN BÖLGESİNİN AMPLİFİKASYONU 58
3.3. PCR ÜRÜNLERİNİN ELEKTROFOREZ İLE GÖRÜNTÜLENMESİ 59
3.4. HEDEF GEN BÖLGESİ AMPLİKONLARININ JELDEN İZOLASYONU 60

3.5. BBIGAMA-1 GENİNİN KLONLANMASI 62
3.5.1. BbigAMA-1 Geninin pJET1/2 Plazmidine Ligasyonu 62
3.5.2. Rekombinant Plazmidin Kompetan Hücrelerine Transformasyonu 63
3.5.3. Klonlanmanın PCR Tarama ile Doğrulanması 64
3.5.4. PCR Tarama ile Transformasyonu Doğrulanmış Kolonilerin Sıvı Besi Yerinde Çoğaltımı 65
3.5.5. Rekombinant Plazmidlerin Saflaştırılması 65
3.5.6. Restriksiyon Enzim ve PCR Analizleri 66
3.6. KLONLANAN BBIGAMA-1 GENİNİN SEKANS, FİLOGENETİK, SNPS VE AÇIK OKUMA ÇERÇEVESİ (ORF) ANALİZLERİ 67
3.7. BBIGAMA-1 PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONU 69
3.7.1. RNA İzolasyonu 69
3.7.2. Tamamlayıcı DNA (cDNA)'nın Sentezi 71
3.7.3. PCR 72
3.7.4. pET 100/D-TOPO Ekspresyon Vektörüne Klonlama 74
3.7.5. BL21 Star (DE3) *E. coli* Kompotent Hücrelerine Transformasyon 79
3.7.6. Pilot Ekspresyon Denemeleri 79
3.7.7. Ekspresyon 88
3.8. REKOMBİNANT BBIGAMA-1 PROTEİNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI 89
3.8.1. ProBond™ Nickel-Chelating Resin ile Protein Bağlanmalarının Western Blot Analizleri ile Kontrolü 93
3.8.2. Saflaştırılmış BbigAMA-1 Rekombinant Proteinlerinin Western Blot Analizleri ile Kontrolü 93
4. BULGULAR 94
4.1. AMA-1 GEN BÖLGESİNİN PCR AMPLİFİKASYON SONUCU 94
4.2. BBIGAMA-1 GENİNİN KLONLANMA SONUÇLARI 95

4.3. KLONLANAN BBIGAMA-1 GENİNİN SEKANS, FİLOGENETİK, SNPS VE AÇIK OKUMA ÇERÇEVESİ (ORF) ANALİZLERİ SONUÇLARI 98

4.4. BBIGAMA-1 PROTEİNLERİNİN EKPRESYON SONUÇLARI 142

4.4.1. PCR Sonucu 142

4.4.2. pET 100/D-TOPO Ekspresyon Vektörüne Klonlama Sonuçları 144

4.4.3. Saflaştırılan Rekombinant Plazmidlerin Kontrol PCR Sonuçları 144

4.4.4. Pilot Ekspresyon Deneme Sonuçları 147

4.4.5. Ekspresyon Sonuçları 156

4.5. REKOMBİNANT BBIGAMA-1 PROTEİNLERİNİN SAFLAŞTIRMA SONUÇLARI 157

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 159

6. KAYNAKLAR 176

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Türkiye'de sığırlarda babesiosis tedavisi için kullanılan ruhasatlı ilaçlar 39

Tablo 3.1. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan ticari kitin içeriği 57

Tablo 3.2. AMA-1 gen bölgesinin amplifikasyonu için PCR'da kullanılan primerler 59

Tablo 3.3.High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) İçeriği 61

Tablo 3.4. RNA Ekstraksiyonunda kullanılan ticari kitin içeriği 69

Tablo 3.5. Ekspresyon analizleri için dizayn edilen primerler 72

Tablo 3.6. PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları 73

Tablo 3.7. PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları 75

Tablo 3.8. PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları 77

Tablo 3.9. Resolving ve Stacking jelin formülasyonu 82

Tablo 4.1. Filogenetik kıyaslamalarda kullanılan, GenBank'a kayıtlı, BbigAMA-1 geninin nükleotid dizilimlerini içeren izolatların aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler 105

Tablo 4.2. Çoklu hizalama analizlerine dahil edilen izolatların BbigAMA-1 geni nükleotid kompozisyonları 106

Tablo 4.3. Elde edilen izolatlar ile Dünyadan analizleri yapılan diğer izolatların BbigAMA-1 geni nükleotid dizilimlerinin ikili hizalama benzerlikleri 107

Tablo 4.4. Elde edilen izolatlar ile Dünyadan analizleri yapılan diğer izolatların BbigAMA-1 geni amino asit dizilimlerinin ikili hizalama benzerlikleri 120

Tablo 4.5. ORF analizleri sonucu nükleotid dizilimlerinde belirlenen çerçeveler 128

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Bazı *Babesia* ve *Theileria* türlerinin 18S rRNA gen bölgelerinin Bayesian analizlerine göre filogenetik akrabalıkları 6

Şekil 2.2. *Babesia bigemina*'nın piroplazmik formları 8

Şekil 2.3. *Babaesia* türlerinin hayat siklusu 13

Şekil 3.1. pJET1.2/blunt CloningVector 63

Şekil 3.2. Rekombinant plazmidin kompetan hücrelerine transformasyonu aşamalarındaki çalışmalar 64

Şekil 3.3. LB sıvı besi yeri ve çalkalayıcı üzerinde ekimi yapılan 5 ml'lik LB sıvı besi yeri içeren flasklar 65

Şekil 3.4. *Aval* ve *Xbal* enzimlerinin bağlanma noktaları 67

Şekil 3.5. pET 100/D-TOPO ekspresyon vektörünün şematik görümü 74

Şekil 3.6. Çalkalayıcılı inkubatörde, 37 °C'de inkubasyona bırakılmış ve IPTG indüklemeleri yapılmış olan LB sıvı besi yerleri 80

Şekil 3.7. SDS-PAGE analizleri 85

Şekil 3.8. Ekspresyon öncesi LB besi yerlerinin hazırlanması ve 37 °C'de 100 rpm'de inkubasyon periyodu 88

Şekil 3.9. LB sıvı besiyerinde üreyen *E. coli* BL21 (DE3) bakterilerinin OD_{600} değerlerinin spektrofotometrede ölçümü 89

Şekil 4.1. *Babesia bigemina*'nın *in vivo* ve *in vitro* pasajlarından elde edilmiş Kayseri/Türkiye suşları gDNA'larının, BbigAMA-1'i kodlayan gen bölgelerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü. 94

Şekil 4.2. Jel ekstraksiyon sonucu elde edilen örneklerin jel elektroforezde görüntüsü. 95

Şekil 4.3. Transformasyon sonucu besi yerinde oluşan koloniler 96

Şekil 4.4. Transformasyon basamağında 2. inkübasyon sonrası oluşan koloniler 96

Şekil 4.5. Transforme hücrelerde BbigAMA-1 genlerinin koloni PCR'ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü. 97

Şekil 4.6. Saflaştırılan plazmidlerin restrüksiyon enzimleri (*Ava 1* ve *Xba 1*) ile kesimi sonucu BbigAMA-1 rekombinant plazmidlerin agaroz jelde kesim yerlerinin görünümü 97

Şekil 4.7. *B. bigemina* Kayseri/Türkiye *in vivo* pasajlanmış suşunun AMA-1 geni nükleotit ve amino asit dizisi 101

Şekil 4.8. *B. bigemina* Kayseri/Türkiye *in vitro* pasajlanmış suşunun AMA-1 geni nükleotit ve amino asit dizisi 104

Şekil 4.9. Elde edilen izolatlar ile GenBank'a kaydedilmiş diğer izolatların çoklu hizalama analizleri sonucu oluşan nükleotid farklılıkları 119

Şekil 4.10. Elde edilen izolatlar ile GenBank'a kaydedilmiş diğer izolatların çoklu hizalama analizleri sonucu oluşan amino asit farklılıkları 123

Şekil 4.11. Elde edilen izolatlar ile GenBank'a kaydedilmiş BbigAMA-1 izolatlarının nükleotid dizilerinin Bayesian analiz yöntemi kullanılarak oluşturulmuş filogenetik ağacı. 125

Şekil 4.12. Elde edilen izolatlar ile GenBank'a kaydedilmiş BbigAMA-1 izolatlarının nükleotid dizilerinin ML analiz yöntemi kullanılarak oluşturulmuş filogenetik ağacı. 126

Şekil 4.13. Elde edilen izolatlar ile GenBank'a kaydedilmiş BbigAMA-1 izolatlarının amino asit dizilerinin ML analiz yöntemi kullanılarak oluşturulmuş filogenetik ağacı. 127

Şekil 4.14. Kayseri/Turkey IV1 izolatının +1 çerçevesi başlangıç ve bitiş kodonları 129

Şekil 4.15. Kayseri/Turkey IT2 izolatının +1 çerçevesi başlangıç ve bitiş kodonları 130

Şekil 4.16. Kayseri/Turkey IV1 izolatının amino asit diziliminin sinyal peptid analizi sonucu tahmini sinyal peptid içeren bölgeler 132

Şekil 4.17. Kayseri/Turkey IT2 izolatının amino asit diziliminin sinyal peptid analizi sonucu tahmini sinyal peptid içeren bölgeler 133

Şekil 4.18. Kayseri/Turkey IV1 izolatının antijenik peptid bölgelerinin analizi sonucu elde edilen tahmini antijenik bölgeler 135

Şekil 4.19. Kayseri/Turkey IT2 izolatının antijenik peptid bölgelerinin analizi sonucu elde edilen tahmini antijenik bölgeler 136

Şekil 4.20. Kayseri/Turkey IV1 izolatının; potansiyel sitoplazmik ve ekstraselüler bölgeleri ile transmembran bölgesi 138

Şekil 4.21. Kayseri/Turkey IT2 izolatının; potansiyel sitoplazmik ve ekstrasellüler bölgeleri ile transmembran bölgesi 139

Şekil 4.22. Kayseri/Turkey IV1 izolatının amino asit dizilimlerine göre tahmini izoelektrik nokta değeri ve moleküler ağırlığı 140

Şekil 4.23. Kayseri/Turkey IT2 izolatının amino asit dizilimlerine göre tahmini izoelektrik nokta değeri ve moleküler ağırlığı 141

Şekil 4.24. Kayseri/Turkey IV1 BbigAMA-1 proteinin üç boyutlu yapısı 142

Şekil 4.25. Kayseri/Turkey IT2 BbigAMA-1 proteinin üç boyutlu yapısı 142

Şekil 4.26. *Babesia bigemina*'nın *in vivo* ve *in vitro* pasajlarından elde edilmiş Kayseri/Türkiye suşları cDNA'larının ekspresyon primerleriyle amplifikasyonu sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü..... 143

Şekil 4.27. Jel ekstraksiyon sonucu elde edilen örneklerin jel elektroforezde görüntüsü. 143

Şekil 4.28. Transforme hücrelerde BbigAMA-1 genlerinin koloni PCR'ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü. 144

Şekil 4.29. Çapraz PCR 1 analizleri sonucu amplikonların jel agarozda görünümü. 145

Şekil 4.30. Çapraz PCR 2 analizleri sonucu amplikonların jel agarozda görünümü. 146

Şekil 4.31. Çapraz PCR 4 analizleri sonucu amplikonların jel agarozda görünümü. 146

Şekil 4.32. *In vivo* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin SDS-PAGE analizi görüntüsü. 148

Şekil 4.33. *In vitro* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin 5. saate göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin SDS-PAGE analizi görüntüsü. 149

Şekil 4.34. *In vivo* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin Western Blot analizi görüntüsü. 150

Şekil 4.35. *In vivo* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin Western Blot analizi görüntüsü. 151

Şekil 4.36. *In vivo* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin 2. saate göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin 1-20 µl jel yüklemelerinin Western Blot analizi görüntüsü. 152

Şekil 4.37. *In vivo* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin 2. saate göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin 1-20 µl jel yüklemelerinin Western Blot analizi görüntüsü. 152

Şekil 4.38. *In vitro* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin Western Blot analizi görüntüsü. 153

Şekil 4.39. *In vitro* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin Western Blot analizi görüntüsü. 154

Şekil 4.40. *In vitro* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin Western Blot analizi görüntüsü. 154

Şekil 4.41. *In vitro* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin Western Blot analizi görüntüsü. 155

Şekil 4.42. *In vitro* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin Western Blot analizi görüntüsü. 155

Şekil 4.43. Ekspresyon sonrası *in vivo* ve *in vitro* BbigAMA-1 proteinlerinin kontrolü. 156

Şekil 4.44. Saflaştırma esnasında toplanan fraksiyonlar ve elde edilen *in vivo* BbigAMA-1 saf proteininin Western Blot analizi. 158

Şekil 4.45. Saflaştırma esnasında toplanan fraksiyonlar ve elde edilen *in vitro* BbigAMA-1 saf proteininin Western Blot analizi. 158

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Babesiosis, *Babesia* türlerinin neden olduğu, tropik ve substropik iklim kuşağında yer alan ülkelerde evcil ve yabani memeli hayvanlar ile insanlarda da yaygın bir şekilde seyreden, hayvancılıkta büyük ekonomik kayıplara sebebiyet veren, veteriner hekimlikte kritik öneme sahip, vektör-borne ve zoonotik karakterli protozoer bir hastalıktır. Babesiosis, Apicomplexa infraphylumunda bulunan *Babesia* soyunda yer alan intra-eritrositik parazit türleri tarafından meydana getirilmektedir. Sığırlarda babesiosis'e yol açan parazit türlerinden biri olan *Babesia bigemina*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) türü keneler tarafından nakledilmektedir.

Babesiosis'e karşı hayvanlarda etkin bir tedavi yöntemi bulunmasına karşın, gerekli korunma tedbirleri alınmadığı takdirde bu yöntem yetersiz kalmakta, aynı zamanda kullanılan etken maddenin oluşturduğu yan etkiler ve ilaç maliyeti de ekonomik anlamda zararlara yol açmaktadır. Korunma tedbirleri arasında kene kontrolü büyük önem taşımaktadır. Ancak kene mücadelesi kapsamında kullanılan akarisidlerin pahalı oluşu, bazı akarisidlere karşı direnç şekillenmesi ve uygulama sırasında hayvan hareketleri ile ilgili düzenlemelerin ve karantinanın tam olarak yapılamaması gibi nedenlerden dolayı bu yöntemle de tam anlamıyla başarı elde edilememektedir. Bu nedenle son yıllarda, mücadele ve korunmada, aşı üretim ve geliştirme çalışmalarına başlanmış ve bu kapsamda üretilen aşılar uygulanmaya çalışılmıştır.

Günümüzde, *B. bigemina*'nın etkeni olduğu babesiosis için genellikle attenüe suşlar aşı olarak kullanılmaktadır. Ancak bu suşlar ile aşılanan hayvanlar doğal şartlardaki vahşi

suşlara karşı direnç gösterememektedirler. Bu nedenle üretilen bu aşılar hastalığa karşı yeterli koruyuculuğu sağlayamamaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, *B. bigemina*'nın yüzey proteinlerinin moleküler ve immunolojik yapıları identifiye edilerek babesiosis'e karşı etkin koruma sağlayabilecek rekombinant aşı adayı hedef proteinleri belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla, yapılan araştırmalarda, özellikle *Babesia* türleri başta olmak üzere diğer tüm apikompleksan parazit türlerinde bulunan, parazitin konak hücreye invazyonundada önemli roller oynayan, apikal kompleks organelleri arasında yer alan, roptri ve mikronemler ile bunlardan salınan proteinler üzerinde çalışılmaya başlanmıştır. Bu proteinlerden biri de mikronem ürünü bir transmembran protein olan Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1)'dir. Tüm apikompleksan parazit türlerinde tip I integral membran protein olarak bulunan AMA-1, parazitin konak hücrelere invazyonu esnasında kritik bir rol oynamaktadır. Son yıllarda konuyla ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, AMA-1'in bir çok apikompleksan parazit enfeksiyonuna karşı geliştirilmeye çalışılan aşılar için hedef proteinler arasında en umut verici protein olarak belirlendiği görülmektedir.

Bu çalışmada, *B. bigemina* Kayseri/Türkiye *in vivo* (1. pasaj) ve *in vitro* (1. pasaj) suşlarından izole edilen AMA-1 proteinin (BbigAMA-1); klonlanarak moleküler genotiplemesinin yapılması, ekspresyonunun sağlanması, immunolojik karakterizasyonlarının araştırılarak her iki suş arasında attenüasyona bağlı olası protein poliformizmlerinin belirlenmesi ve bu proteinin *B. bigemina* enfeksiyonlarına karşı geliştirilmesi, planlanan rekombinant aşılar için hedef protein olabilme potansiyel ve güvenilirliğinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BABESİOSİS'İN TANIMI VE TARİHÇESİ

Apicomplexa infraphylumunda yer alan *Babesia* türlerinin meydana getirdiği, *Ixodidae* ailesine bağlı vektör keneler tarafından transovarial ve transstadial olarak nakledilen bu hastalık, tropik ve subtropik bölgelerde yer alan evcil ve yabani hayvanlar başta olmak üzere insanlarda da görülmektedir. Tick-borne ve zoonotik karakterli babesiosis, aynı zamanda dünyada Lenfatik Filariasis (*Wuchereria bancrofti*, mosquito-borne)'i takiben tarif edilen ikinci vektör-borne enfeksiyondur. Babesiosis, ilk defa 1888 yılında Victor Babes tarafından tanımlanmıştır. Romanya Hükümeti tarafından görevlendirilen Victor Babes, sığırlarda görülen ve hızla yayılan bu hastalığı öncelikle "sığır hemaglobinürisi" veya "red water fever" ile ilişkilendirmiş ve sığır eritrositleri içerisinde keşfettiği mikroorganizmaları *Haematoccus bovis* olarak isimlendirmiştir. Daha sonra aynı mikroorganizmleri koyun eritrositlerinde de gözlemlemiştir (1). Diğer yandan 1893 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde Smith ve Kilborne "Texas Fever" olarak adlandırdıkları hastalığın etkenini *Pyrosoma bigeminum* olarak isimlendirmişler ve bunun bir kene tarafından nakledildiğini bildirmişlerdir (2). Bu bildiri aynı zamanda bir protozoonun arthropod tarafından nakliyle ilgili ilk rapordur. Yine 1893 yılında Starcovici bu parazitlere *Babesia bovis*, *Babesia ovis* ve *Babesia bigemina* isimlerini vermiştir (3). Diğer yandan "Texas Fever" (babesiosis) etkeni *Pyrosoma bigeminum* (*Babesia bigemina*)'un vektör kene *Rhipicephalus* (*Boophilus) annulatus* tarafından sığırlara nakledildiğinin yayınlanmasından sonra babesiosis, dünyanın çeşitli bölgelerinde de keşfedilmiştir. Avustralya'da Dr. Sidney Hunt babesiosis'i (bovine redwater), "Texas fever"'ın identiği olarak konfirme etmiştir.

Arjantin'de, 1903'te Lignieres sığır babesiosisi (Tristeza) için form A ve form C olmak üzere iki form tarif etmiş olup bunlardan birinin Smith ve Kilborne'un tanımladığına benzer şekilde büyük, diğerinin ise daha küçük intraeritrositik etkenler olduğunu bildirmiştir. Aynı araştırmacı, küçük olan etkenin genellikle kan frotilerinde zor görülmesine karşın böbrek ve merkezi sinir sisteminin meningslerindeki kapillarlardan yapılan frotilerde daha kolay tespit edilebildiğini bildirmiş, 1910 yılında bu küçük organizmaları, önce *Piroplasma argentina* daha sonra *Babesia argentina* olarak isimlendirmiştir. *Babesia argentina* ismi Avusturalya ile Güney ve Orta Amerika'da uzun yıllar kullanılmıştır. Bu durum 1970'li yılların ortalarına kadar sürmüş, *B. argentina* ile *B. bovis*'in aynı özelliklere sahip olduğu anlaşılmış ve isimlendirmede *B. bovis*'in kullanımının daha uygun olacağı kabul edilmiştir (4, 5). M'Fadyean ve Stockman 1911'de İngiltere'de yine sığırlarda genellikle eritrositin periferinde yer alan etkenler tespit etmişler ve bunları önce *Piroplasma divergens* daha sonra *Babesia divergens* olarak isimlendirmişlerdir (4, 5). Yine aynı araştırıcılar, 1911 yılında *B. bigemina*'ya benzer büyük bir etkenin bulunduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra Sergent ve arkadaşları 1926 yılında bu etkeni *B. major* olarak adlandırmışlardır (4, 5). Brocklesby 1976 yılında sığırlarda babesiosis etkenlerinden *B. bigemina, B. major, B. bovis* ve *B. divergens*'in önemli olduğunu bildirmiştir. Sığırlardaki *Babesia* türlerinin 1960'lı yılların sonlarında Hoyte ve 1976 yılında Brocklesby tarafından gözden geçirilmesini takiben, *B. bovis* (*B. argentina*; *B. berbara*; *B. colchica*), *B. bigemina*, *B. divergens* (*B. caucasica*; *B. occidentalis*; *B. karelica*) ve *B. major*'ün sığırlarda babesiosise yol açan başlıca türler oldukları kabul edilmiştir (6, 7).

Babesiosis ilk keşfedildiği yılları takiben 1950'li yılların sonuna kadar sadece memeli hayvanların bir hastalığı olarak bildirilmiştir. Ancak 1957 yılında Yugoslavyalı bir çiftçide babesiosis olgusu rapor edildikten sonra söz konusu hastalığın insanlarda da bulunabildiği anlaşılmıştır (8).

Türkiye'de babesiosis, ilk kez 1890 yılında Nicole ve Adil Bey tarafından İstanbul'da sığırlarda tarif edilmiştir. Bunun yanında tarif edilen hastalık etkeninin *B. bigemina* olduğu yine aynı çalışmayla bildirilmiş olup bunu Samuel ve Raif, İbrahim Ekrem, Lestoquard, Gören ve Yetkin, Aysoy'un çalışmaları izlemiştir (9).

Türkiye'de halk arasında "Ağrıma" veya "Ağrık" olarak adlandırılan hastalık üzerine 1950-1980 arasında mikroskobik; 1980'li yılların sonunda mikroskobik bakının yanında serolojik; 2000'li yılların başlarında ise bunlara ilave nükleik asit tabanlı moleküler araştırmalar yapılmıştır (10).

2.2. *BABESIA* TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ

Babesia türleri, The Taxonomicon ile Systema Naturae 2000 ve son moleküler karakterizasyon çalışmalarına göre aşağıda gösterildiği gibi sınıflandırılmıştır (11).

Biota (Canlılar, ekoloji)

Domain: ***Eukaryota*** Chatton, 1925

Kingdom: ***Chromista*** Caval.-Sm, 1981

Subkingdom: ***Harosa*** Cavalier-Smith, 2010

Superphylum: ***Alveolata*** Cavalier-Smith, 1991

Phylum: ***Miozoa*** Cavalier-Smith, 1987

Infraphylum: ***Apicomplexa*** Levine, 1970

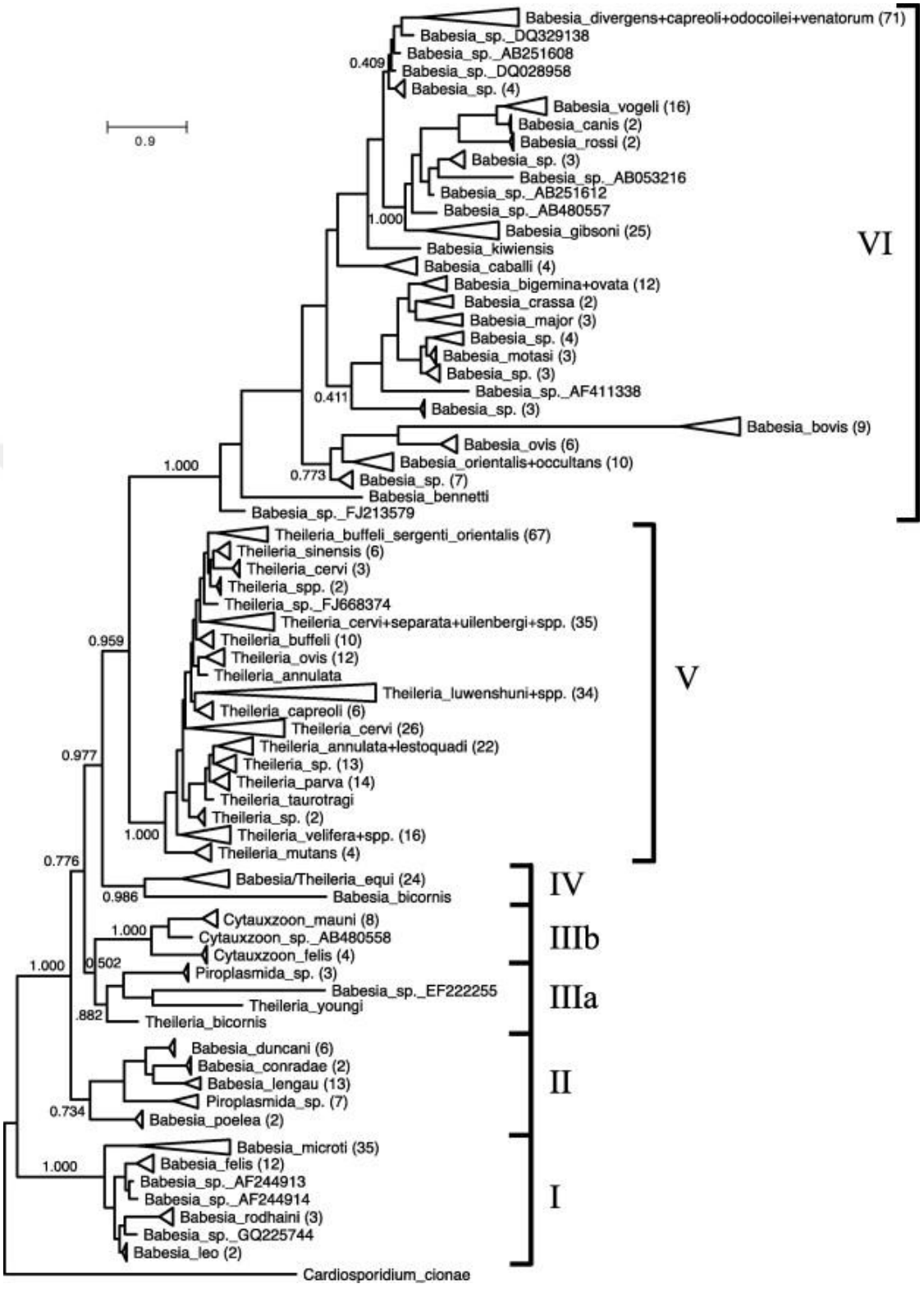
Class: ***Coccidiomorphea*** Doflein, 1901

Order: ***Piroplasmida*** Wenyon, 1926

Family: ***Babesiidae*** Poche, 1913

Genus: ***Babesia*** Starcovici, 1893

Son yıllarda nükleik asit tabanlı moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla beraber günümüze kadar 100'den fazla *Babesia* türü tanımlanmıştır. Araştırmaların bu yönde devam etmesiyle birlikte aynı soya ait yeni türlerinde keşfedilmesi ön görülmektedir. (12). Yapılan filogenetik araştırmalar sonucu bazı *Babesia* ve *Theileria* türlerinin 18S rRNA gen bölgesine göre filogenetik ağacı Şekil 2.1'de gösterilmiştir (13).



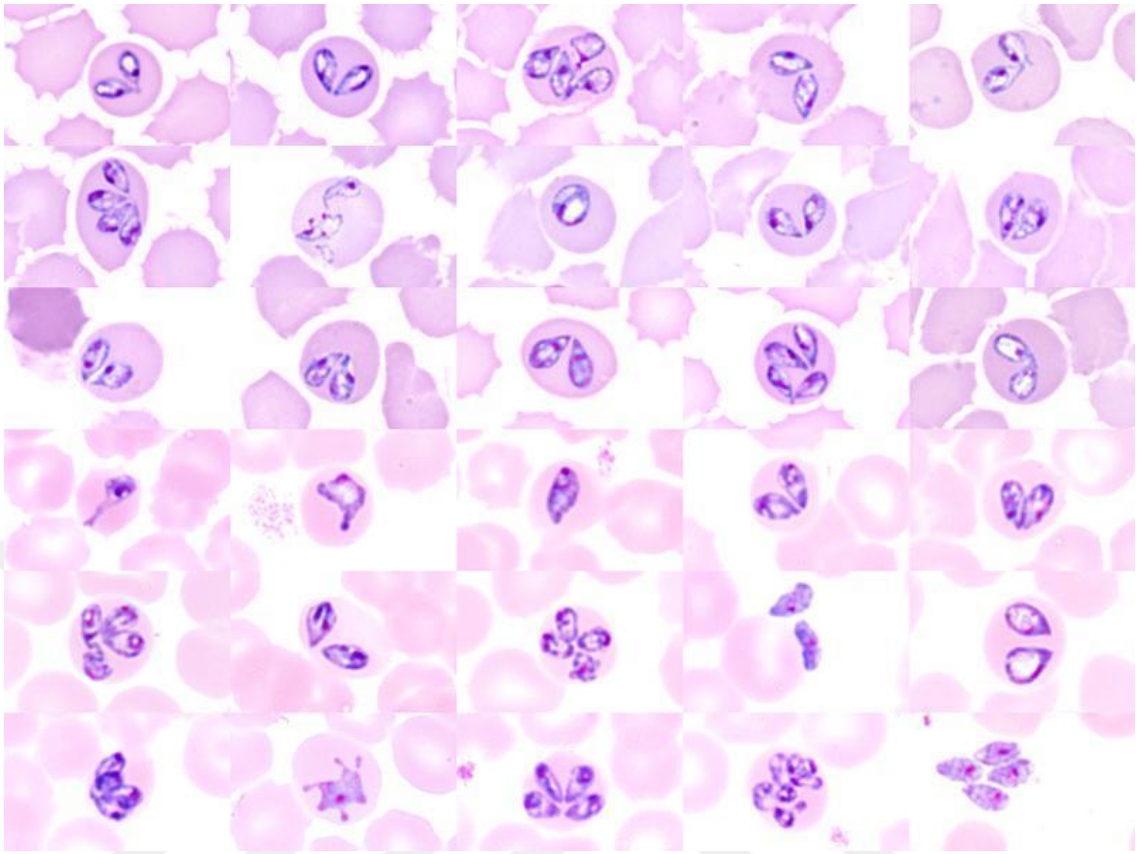
Şekil 2.1. Bazı *Babesia* ve *Theileria* türlerinin 18S rRNA gen bölgelerinin Bayesian analizlerine göre filogenetik akrabalıkları. *Cardiosporidium* sp. dış dal olarak verilmiştir (14)

2.3. SIĞIRLARDAKİ *BABESIA* TÜRLERİNİN GENEL MORFOLOJİLERİ

Sığırlarda babesiosis'e; *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens*, *B. major* türleri sebep olmaktadır. Bu türlerin yanında *B. jakimovi*, *B. occultans* ve *B. ovata* türlerinin de sığırlarda görülebildiği bildirilmiştir (7, 14).

Sığırlarda görülen *Babesia* türleri, büyüklüklerine göre büyük ve küçük *Babesia* türleri olmak üzere iki grupta incelenebilir. Küçük *Babesia* türleri; yuvarlak, tek armut ve çift armut şeklinde olup, 2,5 µ'dan küçüktürler. Büyük *Babesia* türleri ise; yuvarlak, oval veya armut şeklindedirler ve büyüklükleri 2,5 µ ile 4,5 µ arasındadır. *Babesia* türlerinin piroplazm formları, gelişme dönemine göre önce halka, sonra ameboid ve daha sonra armut biçimini almaktadırlar. Çift armut formları veya diğer trophozoit formlar bölünmeyi takiben genç merozoitler (ince ve uzun formlar) halinde ya konak hücresinin parçalanması sonucu veya kendileri enfekte konak hücresini terk ederek diğer sağlam retikulosit ve/veya eritrositlere girerek enfekte ederler ve tekrar yuvarlak, ameboid, halka veya armut şeklini almaktadırlar. Bu sayede de paraziteminin artmasına yol açarlar (5, 15-21). Büyük *Babesia* türlerinin bulunduğu grupta; *B. bigemina*, *B. major*, *B. jakimovi*, *B. ovata* ve *B. occultans* bulunmaktadır. Küçük *Babesia* türlerinin bulunduğu grupta ise *B. bovis* ve *B. divergens* yer almaktadır. Işık mikroskobunda, parazitin morfolojik ayrıntıları gösterilememekle birlikte, küçük ve büyük *Babesia*'lar olarak bilinen iki grup kolaylıkla ayırt edilebilmektedir.

Babesia bigemina Smith ve Kilborne, 1893, büyük *Babesia* türlerinden olup eritrositler içerisinde armut, yuvarlak, oval veya düzensiz şekilli olup genellikle çift armut formundadır. Yuvarlak formları 2-3 µ çapta, uzamış formları ise 4-5 µ uzunluğundadır. Eritrositer formlarda konoid, mikroporlar ve tipik mitokondri yoktur. Buna karşın, anterior ve posterior polar halka ve tipik iki adet roptri bulunur (Şekil 2.2), (22-24).



Şekil 2.2. *Babesia bigemina*'nın piroplazmik formları (25)

Babesia bovis Babes 1888, Starcovici, 1893, küçük *Babesia* türlerindendir. Eritrositler içerisindeki merozoitler; armut, yuvarlak veya düzensiz şekillidirler. Vakuollü taşlı yüzük formları bu tür de yaygın olarak görülür. *Babesia bovis* merozoitleri, 1,5-2,4 µm büyüklüğünde olup genellikle eritrositlerin ortasına yerleşirler (22-24).

Babesia divergens M'Fadyean and Stockman, 1911, küçük *Babesia* türlerindendir (0,4-1,5 µm). Merozoitleri, genelde çift halde bulunurlar, aralarındaki açı geniştir ve genellikle eritrositlerin periferine yerleşirler. Ayrıca tombul, armut şeklinde ve yuvarlak formlar da görülebilir. Merozoitlerde, konoid, mikroporlar, tipik golgi aygıtı ve mitokondri yoktur. Mitokondri benzeri veziküller ve 3 veya daha fazla roptri vardır (22-24).

Babesia major Sergent, Donatien, Parroti Lestoquard and Plantureux, 1926, büyük *Babesia* türlerindendir. Merozoitler, eritrositlerin merkezinde yer alır. Çift armut şeklindeki formlar 1,5x2,6 µm, yuvarlak formlar ise 1,8 µm çapında olup aralarındaki açı dardır (18, 22-24).

Babesia jakimovi, bu tür büyük *Babesia* etkenlerinden olup özellikle Sibirya'da sığırlarda görülmekte, bunun yanında karacalarda ve ren geyiklerinde de hastalığa sebep olmaktadır. Transovaryal olarak *Ixodes ricinus* kenesi tarafından nakledilmektedir. Ayrıca mekanik olarak at sinekleri tarafından da nakledildiği bildirilmiştir. Klinik belirtiler *Babesia bigemina*'ya benzemektedir (16).

Babesia occultans, 3,0 µm uzunluğunda, 2,0 µm genişliğinde, büyük bir *Babesia* türüdür (26).

Babesia ovata, 3,2 µm uzunluğunda, 1,7 µm genişliğinde olup, büyük *Babesia* türleri içinde yer almaktadır (27).

2.4. *BABESIA* TÜRLERİNİN HAYAT SİKLUSU ve GELİŞME ŞEKİLLERİ

Babesia türleri beslenme, gelişim ve çoğalma için mutlak surette konak hücresine bağımlıdır. Heteroksen bir gelişme gösteren bu protozoon türleri söz konusu gelişmelerini omurgalı konaklar ile *Ixodidae* ailesine bağlı kenelerde olmak üzere iki safhada gerçekleştirirler. *Babesia* türleri doğal olarak enfekte kenelerin konaklarından kan emmeleriyle nakledilirler. Hayat sikluslarındaki başlıca farklılıkların, bazı *Babesia* türlerinde [gerçek (true) (=*sensu stricto*) *Babesia* spp.) ve gerçek olmayan (=*sensu-lato*) *Babesia* (*B. microti*-benzeri, örn. *Theileria annae*)] naklin varlığı ile ilgili olduğu bildirilmektedir (16, 28, 29).

2.4.1. Omurgalı Konakta Gelişme

Enfekte kene kan emmek için konağını soktuğunda sporozoitler, konağa enjekte edilirler. Lenfositler veya lenfoblastlar içinde ekstra-eritrositik şizogoni geçiren *B. microti* ve *B. rodhaini* hem söz konusu gelişme şekillerinden dolayı hem de 18S rRNA dizilimlerindeki farklardan dolayı *Theileria* ve *Babesia* soylarının dışında yer almakta dolayısıyla yeni bir soyda sınıflandırılmaları hala araştırmacılar tarafından tartışılmaktadır (30). Bu türler dışında kalan diğer *Babesia* türlerinin sporozoitleri, direk konağın kanına geçerler ve aktif olarak eritrositlere girerler.

Babesia türleri için eritrosit içerisine invazyon, hayat sikluslarının en önemli basamağını oluşturur. Sporozoitler, enfekte kenenin kan emmesi sırasında konak kan dolaşımına geçerek eritrositleri istila ederler. Sporozoitlerin eritrositlere girişi endositozisle olur. Sporozoitin temas ettiği eritrositin yüzeyinde, önce aktin ve

myozinin rol aldığı mekanizma ile bir invaginasyon meydana gelir. Bunu takiben sporozoitler, direkt olarak (vakuol oluşturmadan) konak eritrositine girerler. Bu şekilde eritrosit içerisine giren sporozoitler, trofozoit şekline dönüşürler ve yuvarlak bir şekil alırlar. Bu formda parazitin sitoplazması ribozomlar ile doludur ve endoplazmik retikulum belirgindir. Çekirdeğin etrafında yoğunlaşmış, ilkel golgi aygıtı olarak kabul edilen veziküller vardır. Trofozoitin gelişmeye devam etmesi ile birlikte sitoplazmada değişimler başlar ve yeni organeller meydana gelir. Golgi aygıtından köken alan, bu aygıt ile ilişki halinde olan mikronemler ve roptriler şekillenir. İki katlı bir membranla çevrilmiş olan çekirdekte nükleoplazma, homojen ve nispeten yoğun bir yapıya sahiptir. Çekirdeğin homojen yapısı, trofozoitin tüm gelişimi boyunca, üreme safhalarında ve merozitlerde de aynıdır. Üremeden önce çekirdekte bölünme olmaz. Trofozoitin olgunlaşması ile, sitoplazmada meydana gelen değişimler sonucunda mikronem, roptri, subpelliküler mikrotubuller ve polar halka gibi apikal kompleks'i oluşturan yapılar tekrar meydana gelir. Olgunlaşan trofozoitin uç kısmında tomurcuk şeklinde çıkıntı oluşur ve trofozoit şizogoniye benzer şekilde ikiye bölünerek çoğalır (24, 31, 32). Bu bölünme sırasında parazit; yuvarlak ve oval formlarından, ameoboid ve armut formlarına kadar değişen şekiller alır ki, bunlara **"piroplazmik formlar"** da denilir. Trofozoit, ikiye veya dörde bölünerek kız hücreleri (merozoitler) meydana getirir. Oluşan genç merozoitler (ince ve uzun yapılar), birbirinden ayrılarak eritrosit membranlarını parçalarlar ve sağlam eritrositlere girmek üzere dışarı çıkarlar (33, 34). Eritrositlere girmek isteyen merozoit, başlangıçta söz konusu sağlam eritrositlere rastgele temas eder. Takiben, aktin ve miyozinin rol aldığı bir mekanizmayla apikal complex'in bulunduğu ucunu aktif olarak eritrosit membranına temas edecek şekilde döndürür. Bu spesifik orientasyon, eritrosit membranında invaginasyona neden olur (35, 36). Başlangıçta merozoitin yüzey örtüsü eritrositle zayıf bir bağlanma gerçekleştirir. Apikal kompleks'in eritrosite temas edecek pozisyonu almasıyla birlikte penetrasyon başlar (37). Diğer taraftan merozoitlerin yüzeyinde bulunan komplement 3 (C3) proteininin eritrositlerde bulunan C3 reseptörü ile bağlanması da penetrasyonda önemli rol oynar (38). Tutunmada rol alan önemli moleküllerden biri de merozoitlerin yüzeylerinde surface-coating molekülleridir. Merozoitler bu moleküller ile etkili bir şekilde hedefe odaklanırlar (39). Eritrositlere invazyonda kullanılan ikinci ligand ise merozoitlerin roptri ve mikronem proteinleridir (40). Tutunma esnasında *Babesia* türleri apikal organellerinden merozoit yüzeyine veya konak eritrositi içerisine bazı proteinleri

salgılarlar. Bu organeller parazitin anteriöründe üst kısımda bulunur ve roptri, mikronem ve dense granüllerini kapsar. Özellikle roptri ve mikronemlerden salınan proteinlerin, hücreye invazyonda önemli rol oynadığı bildirilmiştir (41).

Merozoitler, eritrosit içine girdikten sonra trofozoite dönüşür. Trofozoit pinositozla beslenir ve hemoglobini tam olarak sindirir. Sindirimin tam olmasına bağlı olarak eritrositlerde pigment oluşumu şeklinde gözlenen rezidüel maddeler (hemozoin) *Babesia* soyunda bulunan türlerde görülmemektedir (7). Trofozoit ikiye veya dörde bölünerek kız hücreleri (merozoitler) meydana getirir (42). *B. bigemina*'da diploid DNA seviyesine sahip piroplazmlardan farklı olarak **"gamont prekürsörleri (öncül gamontlar)"** adı verilen oval şekilli bir merozoit görülmüştür. Bu gamont prekursörleri, vektör kene tarafından alınıncaya kadar gelişmemektedirler. Diğer yandan enfekte eritrositin parçalanması sonucu serbest kalan merozoitler, diğer sağlam eritrositlere girerek onları da enfekte etmektedirler. Bu şekilde enfeksiyon ya konağın ölümüyle ya da konağın direnç kazanıp parazitleri temizlemesiyle sonuçlanmaktadır (33, 34).

2.4.2. Vektör Kenede Gelişim

Babesia türleri, hayat sikluslarının büyük kısmını vektör kenelerde geçirirler. ***Babesia bigemina*****;** *Rhipicephalus evertsi, R. appendiculatus, R. bursa, R. annulatus, R. decoloratus, R. microplus, R. geigyi, R. australis, R. calcaratus* ve *Haemaphysalis punctata* ile, ***B. bovis*****;** *R. annulatus, R. bursa, R. microplus, R. geigyi, R. calcaratus, R. australis, Ixodes ricinus* ve *I. persulcatus* ile, ***B. divergens*****;** *I. ricinus* ve *I. persulcatus* ile, ***B. major*****;** *R. calcaratus* ve *Haemaphysalis punctata* ile, ***B. jakimovi*****;** *I. ricinus* ile, ***B. ovata***; *Hae. longicornis* ile ***B. occultans*** ise *Hyalomma marginatum* türü keneler ile nakledilmektedirler (5, 22-24, 43, 44).

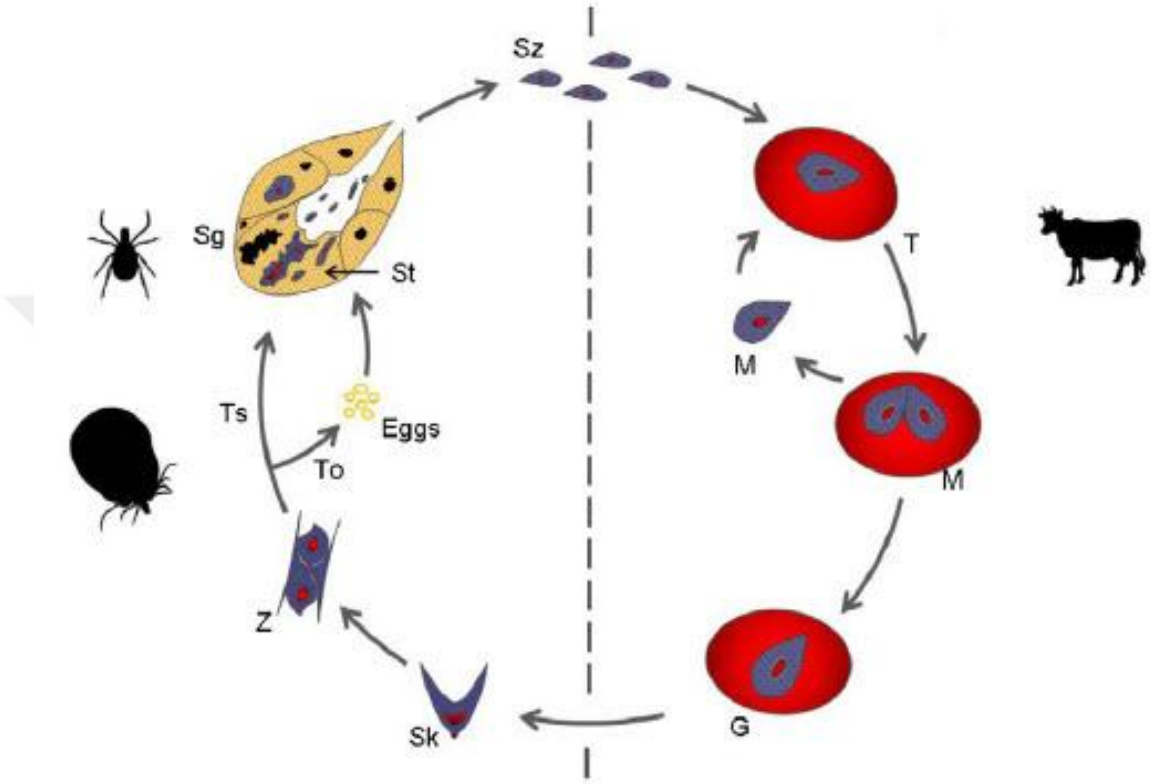
Babesia türlerinin enfekte konaktan kan emen vektör kenede ve vertikal (transovarial) olarak enfekte doğan larvalarda çeşitli gelişim evreleri geçer. Vektör kenenin enfekte konaktan kan emmesi sırasında eritrositler içerisindeki etkeni almasıyla vektördeki gelişim evreleri başlar. Kan emme esnasında alınan eritrosit içerisindeki merozoitler ve özellikle ovoid ve yuvarlak formlu merozoitlerin meydana getirdiği gamontlar, kenenin midesinde gametogoni dönemini başlatırlar. Enfekte kenenin konağından emdiği kan bir taraftan sindirilirken diğer yandan bu kanda parazitler gelişmelerini sürdürürler ve gamontlardan **"strahlenkörper"** adı verilen, çıkıntılı formda ışınsal-cisimciklerinin

(**ray-bodies**) iki populasyonu oluşur (45). Bu arada, bu formlar ortaya çıktıktan sonra da parazit, eritrositler içerisindeki çoğalmasını sürdürür. Çok çekirdekli ışınsal cisimciklerin bir araya gelmesiyle büyük topluluklar oluşur. Bir kez bölünme olduğunda **haploid** sayıda tek çekirdekli ışınsal cisimcikler meydana gelir (42). Daha sonra bu yapıların bir çifti bir araya gelerek **singami** (45) yolu ile küresel hücre olarak da adlandırılan **zigotu** (24) oluştururlar. Oluşan zigot, kene bağırsağında tercihen sindirim hücrelerini enfekte eder. Muhtemelen burada çoğaldıktan sonra, vitellojen sentezleyen bazofilik hücrelere yerleşir. Burada daha fazla bölünmeyle hareket kabiliyetli **ookinetler** (**vermiküller, sporokinetler**) meydana gelir. Üç katlı membranla örtülmüş, ön ucu şemsiye şeklinde, 11-12 µm uzunluğunda ve apikal komplekse ait çok sayıda mikronem, subpelliküler mikrotubul, polar halka ve roptriye sahip olan bu **kinetler**, buradan kenenin hemolenfine göç ederler (46). *Babesia bigemina*, kene bağırsağındaki gelişiminin bazı safhalarında, **haploid sayıda zigot** oluşturmak için tek basamaklı bir mayoz geçirir (42, 43). Kene bağırsak hücrelerinde, poliploid kinetlerin şekillenmesiyle **şizogoni** oluşur (42). Bu çomak şekilli hareketli kinetler kenenin hemolenfine geçerek ovaryumlar dahil olmak üzere hematositler, kas fibrilleri, malpighi tubul hücreleri ile değişik tipte dokuları enfekte ederler. Söz konusu hücre ve dokularda sekonder şizogoninin tekrarlayan siklusları gerçekleşir. Böylece, enfekte kenenin yumurtalarıyla larval döneme transovarial nakil gerçekleşir. Bu nakil, tek konutluluk özelliğine sahip *Rhipicephalus* (*Boophilus*) soyunda bulunan vektör kene türleri için olduğu kadar, *Babesia* türleri için de önemli bir hayat siklusu adaptasyonudur (42).

Transovaryal yolla enfekte doğan larvalarda kinetler, tükürük bezi salgı hücrelerine girerler ve çok çekirdekli dönemlere transforme olurlar. **Sporogoni** yolu ile önce sporoblastlar, sonra sporoblastların parçalanmasıyla küçük, **haploid sayıda sporozoitler** meydana gelir (42).

Bütün *Babesia* türlerinde sporozoit gelişimi, her zaman enfekte kene kan emmek için omurgalı konağına tutunduğunda başlar. Bu aşamada, tükürük bezi asini hücrelerine giden sporokinetler, burada yuvarlaklaşırlar ve daha sonra sporogoni yoluyla çoğalarak önce sporoblastlar sonra da **sporozoitler** oluşur. *Babesia bigemina*'da, sporozoitlerin gelişimi enfekte larvanın konağından kan emmesiyle başlar. Ancak enfektif sporozoitlerin ortaya çıkması, yaklaşık 9 günü alır. Dolayısıyla enfektif sporozitler, sadece kenenin nimf ve ergin dönemlerinde ortaya çıkabilirler (47, 48). Parazitin nakli,

larva döneminin dışında kalan nimf ve ergin (erkek ve dişi) gelişme dönemlerinde gerçekleşebilir (49-51). Bu durum, *B. bovis*'te farklılık gösterir. *Babesia bovis'*te enfektif sporozoitlerin oluşumu, enfekte doğan larvanın konağından kan emmeye başlamasını takiben 2-3 günde gerçekleşir (Şekil 2.3), (22).



Şekil 2.3. *Babaesia* türlerinin hayat siklusu. Enfekte kenenin kan emmesi esnasında memeli konağa verilen sporozoitler (Sz). Sporozoitlerin eritrositlere girmesi sonrasında dönüştüğü trofozoitler (T). Trofozoitlerin ikiye bölünmesiyle meydana gelen merozoitler (M). Bazı trofozoitlerin dönüştüğü gametositler (G). Kene bağırsağında gametositlerin dönüştüğü "Strahlenkörper" (Sk) cisimcikleri. Strahlenkörper cisimciklerinin birleşmesiyle meydana gelen zigot (Z). Zigottan meydana gelen kinetlerin kene hemolenfine girmesi, çoğalması ve ovaryumlara yönelerek ovaryumları enfekte etmesi sonucu oluşan larval döneme nakil, transovaryal (To) nakil. Kenelerin bütün yaşam evrelerinde (larva, nimf, olgun dişi) potansiyel enfektif olabilmesine yol açan transstadial (Ts) nakil. Kinetlerin sporogoni evresini başlatmak üzere kenenin tükürük bezine (Sg) girmesi. Çok çekirdekli sporoblastlara (St) dönüşüm. Sporoblastlardan yeni gelişen sporozoitler kenenin kan emmesiyle memeli konağa nakledilmesi (14)

2.5. BABESİOSİS'İN EPİDEMİYOLOJİSİ VE YAYILIŞI

Babesiosis'in epidemiyolojisinde, vektör-konak arasındaki ilişkilerin belirlenmesinin yanı sıra, bölgenin iklim özellikleri, coğrafik konumu ve vejetasyon durumu da büyük önem arz etmektedir. Vektör kene türlerinin coğrafik dağılımları ve mevsimsel aktiviteleri ile spesifik konakların varlığı, bunun yanında bölgedeki hastalıkların durumu, yayılışı ve mevsimsel dağılımları da bebasiosis'in epidemiyolojisini kavramada önemlidir (4).

Babesisosis, ixodid keneler ile nakledilen bir hastalıktır. Dolayısıyla hastalığın epidemiyolojisinde en önemli faktörlerden biri vektör kenelerin mevsimsel aktiviteleridir. Kenenin aktivasyonunu etkileyen en önemli faktör ise sıcaklıktır. Keneler, sıcaklığın düşük olduğu kış aylarında inaktiftirler (52). *Babesia* etkenlerinin de kenelerde inaktif halde bekledikleri yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (17, 24). 20 °C'de *R. microplus* kenesinde *B. bigemina*'nın transovarial ve transstadial naklinin inhibe olduğu ancak enfekte kene aktive olduktan sonra çeşitli organların hücrelerinde çoğalmanın başladığı ve 1-2 gün sonra sporokinet ve sporozoitler oluştuğu da yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir (24, 52). Ancak bu aktivasyon, kenenin kan emmesi ile sağladığı aktivasyon kadar etkili olmamaktadır (17, 24). Öte yandan, 35 °C gibi yüksek sıcaklıkların sürekliliği halinde enfekte olmayan kenelerde herhangi bir değişiklik olmamasına rağmen enfekte keneler fazla yaşayamamaktadır. Aynı sıcaklık *Babesia* etkenlerinin inhibe olmasına ve hatta tamamen ortadan kalkmasına neden olabilmektedir (15, 17, 24). Ouhelli ve Schein (53), yapmış oldukları bir çalışmada sabit düşük ısıda inkübe edilen enfekte doymuş dişi kenelerin, yüksek ısıda inkübe edilenlere oranla daha zararlı oldukları sonucuna varmışlardır.

Nisbi nem ve ışık, hem vektör kenelerin gelişmesi bakımından hem de hastalığın nakli açısından önemli olan diğer faktörlerdendir. Nemin az olduğu, kuraklığın görüldüğü yerlerde dişi kenelerin toprağa bıraktığı yumurtaların çoğu kurumakta, kuruyan yumurtalardan larva çıkmamakta ve dolayısıyla kene popülasyonunda azalma meydana gelmektedir. Diğer yandan, gömlek değiştirmek üzere toprağa düşmüş 2-3 konaklı keneler söz konusu kuraklıktan dolayı ölebilmektedirler (54). Laboratuvarlarda yapılan üretim ve kolonizasyon çalışmalarında genellikle optimum %85 nisbi nem sağlayan inkubatör ortamları tercih edilmektedir (55, 56).

Babesiosis'in epidemiyolojisinde, konak sığırın ırkına, yaşına bağlı faktörler farklılıklar gösterse de özellikle hayvanın yaşadığı coğrafik bölge koşulları ele alındığında önem arz etmektedir. Endemik stabil bir bölgede yaşayan ineklerden doğan yavrular kolostral bağışıklık sebebiyle hastalığa karşı direnç göstermektedirler. Ancak bu bağışıklık 2 ayda sona ermektedir. Takiben, 4-7 ayda sona eren yaş direnci oluşmaktadır. Genellikle bu tür sığırlarda, ilk 6-9 ayda babesiosis nadiren klinik semptom göstermekte ve hayvanda uzun süreli bir bağışıklık şekillenmektedir. Bu bölgelerde yaşayan sığırların

%75'inin ilk 9 ayda babesiosis'e yakalanmaları durumunda, bu bölgede endemik stabilitenin korunacağı ve klinik hastalığa nadiren rastlanacağı bildirilmiştir (57, 58).

2.5.1. Sığır Babesiosisi'nin Dünya'daki Yayılışı

Sığır babesiosis'i ile ilgili Dünya'da birçok çalışma yapılmıştır. Sığır babesiosis'i, tropik ve subtropik bölgelerde yaygın olarak görülmekle birlikte değişik patojenik *Babesia* türleri ve farklı türlerdeki kenelerin vektörlük yapabilmeleri nedeniyle global bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (59).

Babesia bovis ve *B. bigemina* Afrika, Amerika, Asya, Avustralya ve Avrupa'da görülürken *B. major*, Asya ve Avrupa'dan bildirilmiştir. *B. occultans*, Afrika ve Asya'dan, *B. ovata* Asya'dan, *B. divergens*, Avrupa ve Asya'dan, *B. jakimovi* ise Sibirya'dan rapor edilmiştir (10, 14).

Dünya'da sığır babesiosis'in serolojik prevalansı; Belçika'da %10,7-20 (60), Macaristan'da %0,3 (61), İtalya'da %23,1 (62), Yunanistan'da %2,7-21,6 (63), Portekiz'de %52-79 (64), Güney Afrika'da %19,47-63,3 (65-68), Kuzey Afrika'da %10,8-42,2 (69), Sudan'da %6,1 (70), Kenya'da %0,42-49 (71, 72), Nijerya'da %55-93 (73), Malezya'da %16-74,4 (74, 75), Hindistan'da %23,33-56,11 (76), Brezilya'da %86-99,2 (77-79), Tayland'da %68,8-75,8 (80), Mozambik'te %22,8-48,1 (81), Arjantin'de %20 (82), Tanzanya'da %6-96 (83-85), Guatemala'da %89,6-95,8 (86), Bolivya'da %24-78 (87), Zimbabve'de %32-52 (88), Karayipler'de %52-62 (89), Paraguay'da %71-79 (90), Venezüella'da %38,8-78,2 (91), El Salvador'da %70,5-73,5 (92) ve Guyana'da %16-80 (93) olarak bildirilmiştir.

Dünya'da sığır babesiosis'inin moleküler prevalansı; İspanya'da %0,75-6 (94-96), Portekiz'de %4,2-71 (64, 97), Sudan'da %0,3-48,9 (70, 98, 99), Tayvan'da %0,6-1,9 (100), Mozambik'te %27-90 (101), Tunus'ta %4,3-6,8 (102), Zimbabve'de %35-47 (103), Arjantin'de %34 (82) ve Meksika'da %60,1-66,7 (104) olarak rapor edilmiştir.

2.5.2. Sığır Babesiosisi'nin Türkiye'deki Yayılışı

Babesia bigemina tropik ve subtropik iklim kuşağında birçok ülkede görülmektedir. Özellikle, Afrika, Avustralya, Avrupa, Orta Doğu, Orta ve Güney Amerika'da yaygın olarak görülür, Amerika Birleşik Devletleri'nde ise eradike edilmiştir.

Türkiye'de ilk olarak 1890'da Nicole ve Adilbey tarafından mikroskobik tarifi yapılan *B. bigemina*'nın yol açtığı sığır babesiosis'i çalışmaları; İbrahim Ekrem (105), Lestoquard (106), Gören ve Yetkin (107), Aysoy (108), Mimioğlu (109), Kurtpınar (110)'ın araştırmaları ile devam etmiştir. Mimioğlu (109) Karadeniz Bölgesi'nde mikroskobik bakısını yaptığı 70 sığırın 5'inde, Göksu (111) Ankara civarında 996 sığırın 6'sında ve takiben Özcan (112) Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine getirilen 194 sığırın 2'sinde *B. bigemina*'yı pozitif bulmuşlardır. Diğer yandan Erkut (113) Ege Bölgesi'nde incelediği 141 sığırın 7'sinde piroplazmosis görüldüğünü; Göksu (114) Karadeniz Bölgesi'nin bazı illerinde 37'si babesiosis'den şüpheli, 43'ü sağlıklı toplam 80 sığırın 3'ünde, yine aynı araştırıcının Doğu Anadolu sığırları (115) ile Türkiye'nin farklı bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları üzerine yaptığı araştırmasında (116) Ege ve Marmara Bölgelerinde *B. bigemina*'nın bulunduğu rapor edilmiştir. Takiben Hoffman et al. (117) Türkiye'nin Asya bölümünde sığırlarda piroplazmosis vakalarının yaygın olduğunu ve muayenesi yapılan sığırların %3,5'inde hastalığın *B. bigemina*'dan kaynaklandığını; Mimioğlu ve ark. (118) Türkiye'de *B. bigemina*'nın diğer *Babesia* türlerine göre daha yaygın olduğunu ileri sürmüştür. Öte yandan OİE'nin Türkiye'de sığırlarda ve koyunlarda anaplasmosis, piroplazmosis ve theileriosis'in yaygınlığı ve bu hastalıkların kontrolü hakkında 1976'da Bull Off Int Epiz'da yayınlamış olduğu ilk resmi ülke raporu, tick-borne enfeksiyonlar için önemli bir miladı oluşturmuştur (119). Takip eden dönemlerde, mikroskobik olarak *B. bigemina*; İstanbul ve çevresinde piroplazmozis semptomu gösteren 112 sığırın 13'ünde (120), Elazığ yöresinde 69 piroplazmosis şüpheli sığırın 4'ünde (121), Ankara'nın Beytepe köyünde 185 sığırın 3'ünde (122) görülmüştür. Öte yandan *B. bigemina*'nın Van Bölgesi sığırlarında bulunduğu (123), Karadeniz Bölgesi'nde 76 sığırın 72'sinde *Babesia* sp. saptandığı rapor edilmiştir (124). Aynı dönemde Ankara'nın Çubuk ilçesinde *B. bigemina*'nın mikroskobik insidensi %18,8 olarak bulunmuştur (125). Diğer yandan *B. bigemina*'nın mikroskobik prevalansı, Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde %0,5-1 arasında (126), Samsun yöresi sığırlarında %32,21 (127); Kayseri yöresinde %6,8 (128) olarak rapor edilmiştir. Takiben *Babesia* spp. prevalansı, Konya yöresinde %11,46 (129), Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde %0,6-1,4 arasında (130), Adana yöresinde ise %31,8 (131) oranında bildirilmiştir. Diğer yandan Konya'da Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine getirilen 11 günlük bir buzağıda *B. bigemina*'dan ileri gelen akut

babesiosis olgusu tespit edilmiştir (132). Sevgili ve ark. (133) Şanlıurfa ilinde 191 sığır üzerinde yürüttükleri bir çalışmada kan örneklerinin mikroskobik incelenmesi sonucu babesiosis prevalansını %9,94 olarak saptamışlardır. Karadeniz Bölgesi'nde 542 sığır üzerinde yapılan bir çalışmada ise, mikroskobik analizler sonucu babesiosis prevalansı %1,7 olarak tespit edilmiştir (134). Sivas'ta 240 sığırdan alınan kan örneklerinin mikroskobik incelemelerinde %5,83 oranında *Babesia* sp. saptanmıştır (135). Öte yandan, Marmara ve Ege Bölgesi'nde bulunan 9 ilde toplam 235 sığır üzerinde yürütülen bir araştırmada mikroskobik analizler sonucu babesiosis'e yol açan piroplazmik formlar tespit edilememiştir (136).

Türkiye'de sığırlarda babesiosis'in serolojik teşhisi, IFAT ile seroinsidens şeklinde ilk kez Ankara'da yapılmış ve 185 sığırın 9'unda *B. bigemina*'ya karşı antikor saptanmıştır (137). Takiben bir kısım araştırıcı (122, 124, 125, 128-130, 138-144) IFAT ile *B. bigemina'*ya karşı antikor araştırmıştır.

Sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine yapılan çalışmalarda *B. bigemina*; Karadeniz Bölgesi'nde 76 sığırın 47'sinde (%61,84) (124), Ankara'nın Çubuk ilçesinde ise %100 bulunmuştur (125). Takiben *B. bigemina* seropozitifliği; Ankara civarında %49 (139), %80 (140), %7,3 (143) ve %8,8 (142); Adana yöresinde %55 (145) ve %75 (141); Elazığ'da %31,9, Malatya'da %7,1 ve Tunceli'de %7,3 (130); Konya yöresinde %53,07 (129); Kayseri yöresinde %23,03 (128) ve Antakya yöresinde %0,9 (144) olarak bildirilmiştir. Türkiye genelinde *B. bigemina* seropozitifliği, Karadeniz Bölgesi'nde %61,8, Doğu Anadolu Bölgesi'nde %42,9, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde %48,8, Akdeniz Bölgesi'nde %50,8, Marmara Bölgesi'nde %48,9 ve Ege Bölgesi'nde %68,5 olarak rapor edilmiştir (140). Öte yandan Türkiye'de sığır babesiosis'inin mevsimsel seroinsidensi ve hastalık insidensi, ilk kez Çukurova bölgesinde araştırılmış ve yapılan seroepidemiyolojik yoklamayla mevsimsel seroinsidens *B. bigemina* için 0,600, hastalık insidensi ise 0,030 olarak saptanmıştır (141). Şanlıurfa'da yapılan bir çalışmada 191 sığır kan örneği IFA testine tabii tutulmuş ve *B. bigemina* prevalansı %43,97 olarak hesaplanmıştır (133). Sivas'ta yapılan bir çalışmada incelenen 120 sığır serumunun 45'inde (%37,5) *B. bigemina*'ya karşı antikor pozitifliği belirlenmiştir (135). Türkiye genelinde yapılan diğer bir çalışmada ise 81 ilden 3773 sığırdan kan serumu toplanmış *B. bovis* ve *B. bigemina* seroprevalansını tespit etmek amacıyla IFA testi yapılmıştır. IFA testi ile incelenen 3773 sığır serumunun

%16,9'u sadece *B. bigemina*, %9,46'sı ise hem *B. bovis* hem de *B. bigemina* antikorları yönünden pozitif bulunmuştur (146). Karadeniz Bölgesi'nde yapılan seroepidemiyolojikal bir araştırmada, Samsun, Sinop, Kastamonu, Amasya, Tokat, Ordu ve Giresun illerinde, toplam 27 köy ve 77 çiftlikte yürütülen bir çalışmada 256 sığırdan toplanan kan örnekleri IFA testi ile incelenmiş ve sığırların %38,6'sının *B. bovis*, %14,8'inin *B. bigemina* ve %6'sının *B. bovis-B. bigemina* mix enfekte olduğu bildirilmiştir (147).

Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmelere paralel olarak, hastalık etkenlerinin DNA'sını ortaya koymaya yönelik moleküler yöntemler (Polymerase Chain Reaction (PCR), Reverse Line Blotting (RLB), Nested PCR, Real-Time PCR vb.) ortaya çıkmış ve kullanılmaya başlanmıştır (148). Günümüzde bu yöntemler, hastalık etkenlerinin teşhisinde tercih edilir olmuşlardır.

Türkiye'de PCR ile sığırlarda babesiosis'in teşhisi ilk defa Tanyüksel ve ark. (149) tarafından yapılmış olup *B. bigemina* Ankara yöresinde %8,45, Burdur yöresinde %8 ve Kayseri yöresinde %5 olarak bulunmuştur. Bunu takiben Türkiye'de ilk defa RLB ile yapılan çalışmada, Ankara yöresinde *B. bigemina* pozitifliği %6 olarak saptanmıştır (143). Kayseri yöresinde sığırlarda *B. bigemina*'nın moleküler prevalansı %0,6 (150) ve yine Kayseri'de sığır barınaklarından toplanan kenelerde Türkiye'de ilk defa RLB ile *B. bigemina*'nın moleküler prevalansı %14 olarak tespit edilmiştir (151). Diğer yandan Türkiye'nin çeşitli yörelerinden elde edilen *B. bigemina* izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (152, 153). Ayrıca Kayseri yöresinde sığırlardan toplanan keneler üzerinde yapılan moleküler çalışmalar sonucu *Babesia* sp. saptanmış ve bu suş *Babesia* sp. (Kayseri 1) olarak GenBank'a kayıt ettirilmiştir (151). Doğu Karadeniz Bölgesi'nde sığırlar üzerinde yapılan moleküler çalışmada *B. bigemina* %0,77 oranında tespit edilmiştir (154). Karadeniz Bölgesi'nde 542 sığır üzerinde yapılan bir çalışmada, toplanan kan örnekleri RLB analizlerine tabii tutulmuş ve elde edilen sonuçlara göre *B. bigemina* prevalansı %2,2 olarak saptanmıştır (134). Aktas and Ozubek (155) Bartın'da 100 sığır kan örneği üzerinde yaptıkları bir araştırmada teşhis yöntemi olarak RLB kullanmışlar ve *B. bigemina* prevalansını %1 olarak bildirmişlerdir. Erzurum'da meraya çıkmış ve sağlıklı görünümlü farklı yaş, cinsiyet ve ırkta toplam 300 sığıra ait tam kan örnekleri üzerinde yapılan bir çalışmada Real Time PCR yöntemi kullanılmış ve *B. bigemina*'nın prevalansı %5,7 olarak

belirlenmiştir (156). Zhou et al., (157) Türkiye'nin 6 ilinde; [Konya (n=110), Karaman (n=12), Adana (n=13), Şanlıurfa (n=9), Diyarbakır (n=13) ve Kırklareli (n=39)] PCR tekniğini kullanarak yapmış oldukları bir çalışmada *B. bigemina* prevalansını %11,2 olarak bildirmişlerdir.

Türkiye'de *B. bovis*, ilk kez Mimioğlu (109) tarafından Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu vilayetlerinde sığırlarda "*Haemataurai vesicalis bovis*" araştırması ile gündeme gelmiş; Göksu (111) Ankara'da incelediği 996 sığırın 2'sinde, takiben aynı araştırıcı (114) bazı Karadeniz illerinde mikroskobik bakısı yapılan 80 sığırın 3'ünde *B. bovis*'i bulmuştur. Göksu (116) Türkiye'nin farklı bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları üzerine yaptığı araştırmasında *B. bovis*'in Marmara ve Güney Doğu Anadolu'da görüldüğünü; Mimioğlu ve ark. (118) *B. bovis* (*Babesia berbera*) Karadeniz bölgesinde daha fazla bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Öte yandan mikroskobik bakıyla, Elazığ yöresinde iç organlarından froti yapılan 4 sığırın 1'inde (121) ve Ankara'da 185 sığırın 1'inde (137) *B. bovis* saptanmıştır. *Babesia bovis*'in mikroskobik pozitifliği; Marmara bölgesinde %34,8 (120), Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde %0,5-1,5 arasında (126); Samsun yöresinde %29,53 (127), Kayseri yöresinde %1,04 (128) bulunmuş ve mikroskobik insidensi Ankara'nın Çubuk ilçesinde %9 olarak saptanmıştır (125).

Babesia bovis seroinsidensi; IFAT ile Ankara'nın Beytepe köyünde 185 sığırın 18'inde (122, 137), Ankara yöresinde 46 sığırın 22'sinde (138), Karadeniz bölgesinde 76 sığırın 34'ünde (%44,73) (124), Ankara'nın Çubuk ilçesinde %59 (125) bulunmuştur. Çukurova bölgesinde sığır babesiosis'inin mevsimsel seroinsidensi *B. bovis* için 0,292 ve hastalık insidensi ise 0,030 olarak saptanmıştır (141). *Babesia bovis* seropozitifliği; Türkiye genelinde ELISA ile %51,2 (158); IFAT ile Ankara civarında %10,4 (139), %41,6 (140), %1,3 (143) ve %2,4 (142); Elazığ'da %1,4 ve Tunceli'de %0,6 (130); Kayseri yöresinde %1,04 (128); Doğu Anadolu'da %5,6, Güneydoğu Anadolu'da %6,4, Akdeniz'de %31,6, Ege'de %51,4 ve Marmara'da %41,8 (140) olarak saptanmıştır. Sivas'ta yapılan bir çalışmada incelenen 240 sığır serumunun 32'sinde (%13,3) *B. bovis'*e karşı antikor pozitifliği belirlenmiştir (135). Türkiye genelinde yapılan diğer bir çalışmada ise 81 ilden 3773 sığırdan kan serumu toplanmış *B. bovis* ve *B. bigemina* seroprevalansını tespit etmek amacıyla IFA testi yapılmıştır. IFA testi ile incelenen 3773 sığır serumunun %24,5'i *B. bovis* antikorları yönünden pozitif bulunmuştur (146).

Diğer yandan Türkiye'de *B. bovis*'in moleküler prevalansı; PCR ile Ankara yöresinde %12,68, Burdur yöresinde %8 ve Samsun yöresinde %3,85 (149); RLB ile Ankara yöresinde %2,3 (143), Trakya bölgesinde %1,3 (159) olarak saptanmıştır. Karadeniz Bölgesi'nde 542 sığır üzerinde yapılan bir çalışmada, toplanan kan örnekleri RLB analizlerine tabii tutulmuş ve elde edilen sonuçlara göre *B. bovis* prevalansı %1,8 olarak saptanmıştır (134). Marmara ve Ege Bölgesinde yapılan bir araştırmada ise teşhis metodu olarak RLB kullanılmış ve toplam *B. bovis* prevalansı %0,42 olarak tespit edilmiştir (136). Aktas and Ozubek (155) Bartın'da 100 sığır kan örneği üzerinde yaptıkları bir araştırmada teşhis yöntemi olarak RLB kullanmışlar ve *B. bovis* prevalansını %9 olarak bildirmişlerdir. Erzurum'da meraya çıkmış ve sağlıklı görünümlü farklı yaş, cinsiyet ve ırkta toplam 300 sığıra ait tam kan örnekleri üzerinde yapılan bir çalışmada Real Time PCR yöntemi kullanılmış ve *B. bovis*'in prevalansı %9,3 olarak belirlenmiştir (156). Diğer yandan Türkiye'nin çeşitli yörelerinden elde edilen *B. bovis* izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (152, 153).

Türkiye'de *B. divergens* ile ilgili sınırlı çalışmalar mevcuttur. Karadeniz Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada, babesiosis klinik semptomları gösteren bir sığırda *B. divergens* piroplazmik formları mikroskobik olarak saptanmış ve gösterilmiştir (155). Bu türle ilgili serolojik çalışmalar da sınırlıdır. Ankara yöresinde (138) ve Ankara'nın Beytepe köyünde (122, 137) IFAT ile yapılan seroinsidens çalışmalarında ve Antakya yöresinde (144) IFAT ile yapılan seroprevalans yoklamasında *B. divergens*'e karşı antikor saptanamamıştır. Buna karşılık IFAT ile Karadeniz Bölgesi'nde yapılan seroinsidens çalışmasında 76 sığırın 57'sinde *B. divergens*'e karşı antikor oluştuğu saptanmıştır (124). Diğer yandan *B. divergens* seropozitifliği; Doğu Anadolu'da %3,7, Akdeniz'de %7,2, Ege'de %18,5, Marmara'da %2 ve Karadeniz'de %75 (140); Elazığ'da %3,5, Malatya'da %0,6 ve Tunceli'de %1,2 (130) ve Kayseri yöresinde %2,09 (128) olarak bildirmiştir. Çukurova'da sığır babesiosis'inin mevsimsel seroinsidensi *B. divergens* için 0,121; hastalık insidensi ise 0,030 olarak saptanmıştır (141).

Türkiye'de *B. divergens*'in moleküler prevalansı; PCR ile Samsun yöresinde %3,37 (149); Ankara yöresinde RLB ile %1,1 olarak saptanmıştır (142).

Babesia major'un Türkiye'nin Marmara bölgesinde varlığı iddia edilmiş (160) fakat bugüne kadar mikroskobik ve serolojik olarak pozitiflik bildirilmemiştir. Ayrıca, son

yıllarda RLB ile yapılan araştırmalarda *B. major*'ün moleküler pozitifliği Ankara yöresinde %0,2 olarak saptanmıştır (142). Bunun yanında Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada 389 sığır kan örneği RLB yöntemi ile incelenmiş ve iki örnekte (%0,51) *B. major* tespit edilmiştir (161).

Aktas and Ozubek (155)'in Karadeniz Bölgesi'nde, RLB tekniğini uyguladıkları bir çalışmalarında *Babesia occultans*'ın prevalansını %3 olarak rapor etmişlerdir. Öte yandan, *B. jakimovi* ve *B. ovata* ise Türkiye'den henüz bildirilmemiştir.

2.6. BABESİOSİS'İN KLİNİK BELİRTİLERİ

Babesiosis'in en tipik klinik belirtileri; eritrositlerdeki yıkımlara bağlı olarak ortaya çıkan anemi ve 41,5-42 ^{o}C'ye ulaşan yüksek ateştir. Bunun yanında ikterus, iştahsızlık, dehidrasyon ve hemoglobinüri babesiosisli hayvanlarda görülen klinik semptomlardandır (162).

Klinik belirtiler etkenin vektör kene tarafından konaklara verilmesini takiben 2-12 gün içerisinde ortaya çıkmaktadır. Hasta hayvanlarda klinik belirtiler *Babesia* türleri veya suşlar arası virulans farklılığına ve sığırın ırkına göre farklılık gösterebilmektedir. Hastalık etkenleri özellikle erişkin hayvanlar için daha patojeniktir. Bir yaşından küçük olan hayvanlar anneden kolostrumla geçen antikorlar sebebiyle hastalıktan ciddi oranda etkilenmemektedirler. Hasta hayvanlarda, paraziteminin artmasına bağlı olarak 42 ^{o}C'ye çıkan ateş bir hafta kadar devam edebilmektedir. Bununla birlikte iştahsızlık, solunum sayısında artış, kas titremeleri, anemi, sarılık ve ağırlık kaybı da görülür. Ayrıca, hayvanlarda anoreksi ve ruminal atoni görülür. Dışardan gözlendiğinde hayvanların tedirgin oldukları, gölgelik alanlara sığınmaya çalıştıkları ve sürekli yerde yatma isteğinde oldukları görülür. Hayvanlar bulundukları yerde kendi etraflarında kavis çizerler, tüyleri karışmış ve kabarmış olup nefes alışverişlerinde güçlük ve taşikardi görülür. Başlangıçta müköz membranlar kırmızıdır fakat eritrositik yıkımı takiben anemiye bağlı müköz membranlarda soluklaşma oluşur. Anemi çok hızlı bir şekilde meydana gelir ve yaklaşık olarak eritrositlerin %75'i birkaç gün içerisinde yıkımlanır. Buna bağlı olarak da hemoglobinüri ve hemoglobinemi şekillenebilir. Hemoglobinüriyi takiben ikterus ortaya çıkar. Hasta hayvanlarda kilo kaybı ve süt veriminde azalmalar görülür. Kan suludur (18, 163, 164).

Babaesia bovis diğer sığır *Babesia* türlerine göre daha patojen bir türdür. *B. bovis* enfeksiyonlarında, enfekte eritrositlerin beyin kapillarlarına yapışmasına bağlı olarak merkezi sinir sistemi bozuklukları da şekillenebilmektedir. Hastalığın ileri safhalarında tremorlar ve koma şekillenebilir. Ayrıca konstipasyon veya diare görülebilmekte ve gebeliğin son döneminde abort şekillenebilmektedir. Hastalık boğalarda geçici infertiliteye neden olabilir. *B. bovis*'in beyin ve böbrekteki kapillar damarlara yerleşme eğilimi vardır ve sık sık bu organlarda hasara sebep olarak klinik belirtilerin şekillenmesine yol açmaktadırlar. Cerebral babesiosis geliştiği durumlarda hayvanlarda bilinçsizce hareket ederler, koordinasyon bozukluğu oluşur ve sonucunda ölüm görülür. *B. bovis* enfeksiyonlarında beyin kapillarlarının tıkanmasına bağlı olarak 12-36 saat içerisinde perakut ölüm şekillenebilmektedir (18, 23, 43, 165-167).

Babesia bigemina izolatlarının patojeniteleri farklılıklar gösterilebilir. Yapılan bir çalışmada; Avustralya'daki sığırlarda tespit edilen *B. bigemina* suşunun hayvanlarda nadiren enfeksiyona sebep olduğu, buna karşın Afrika'da tespit edilen suşun ise çok daha patojenik olduğu rapor edilmiştir (15). *B. bigemina* enfeksiyonlarında, hemoglobinüri, çoğunlukla olmasına karşın bazı olgularda görülmeyebilir. Patojenik etkileri ise daha çok eritrosit yıkımı ile alakalıdır. Parazit, eritrosit içinde sürekli aseksüel bölünmeyle çoğalarak intravasküler hemolize neden olur ve bunun sonucunda da hemolitik anemi şekillenir (168). *B. bigemina* çoğunlukla dolaşım kanında bulunur. Ancak beyin kapillarlarına da gidebilir. Bazı enfeksiyonlarda beyin kapillarlarının tıkanmasına bağlı olarak 12-36 saat içerisinde perakut ölüm şekillenebilir. Akut olgularda, 4-8 gün içinde ölüm görülür. Tedavi edilmeyen hayvanlarda mortalite, %50-90 arasında değişir. Kronik durumlarda ise ateş çok yüksek değildir ve genellikle hemoglobinüri görülmez (18, 163, 164).

Babesiosis'li hayvanlarda hematolojik ve biyokimyasal parametrelerde de değişiklikler olmaktadır. *B. bigemina* ile enfekte sığırlarda hastalığın süresi ve şiddetine bağlı olarak eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı ve hematokrit değerlerde önemli derecede azalmalar olmaktadır. Serumda transaminazlar (SGOT, SGPT), alkalin fosfataz, konjuge olmamış bilirubin ve kan üre nitrojen seviyelerinde bir yükselme ve enfeksiyonun geç döneminde kalsiyumda bir azalma görülmektedir. Total serum proteinlerinde ise biraz azalma dikkati çekmektedir. Plazma fibrinojeninin yapısında da değişiklikler olmaktadır (5, 9, 15, 169, 170).

2.7. BABESİOSİS'İN PATOGENEZİ

Babesiosis'in akut fazında ortaya çıkan aneminin oluşumunda kallikrein-kinin sistemi önemli bir yere sahiptir. Eritrosit yıkımından hemen önce, konağın plazma bileşimindeki değişimler sonucu kallikrein aktif hale geçer. Enfeksiyonun başlamasından hemen sonra antijen-antikor reaksiyonu veya doku hasar ürünleri ile ilgili olarak kinin ve aktif kallikrein düzeyi artar, kininojen seviyesi azalır. Bunlara bağlı olarak damarlarda dilatasyon, kan akışında yavaşlama, kılcal damar duvarlarında bozulmalar olur ve damar duvarlarının geçirgenliği artar. Bunun sonucu olarak da şok meydana gelmektedir Konglutinin ve fibronektin düzeylerinin azalması sonucu eritrositlerde kümelenme ve kapillar damarlarda tıkanmalar şekillenir. Fibrinojen ile ilgili ürünler artar, plazminojen azalır ve buna bağlı olarak koagulasyon bozuklukları ve eritrosit birikimi görülür. Eritrositler, beyin dahil iç organların mikrokapillar sisteminde kümelenir ve damarların tıkamasına yol açar. Bu tip patogenez, daha çok parazitli eritrositlerin kümelenerek damarları tıkadığı *B. bovis*'de görülür (23, 163). Bu kapillar blokajın olmadığı *B. bigemina* ve *B. divergens* enfeksiyonlarında ise en önemli patolojik etki, eritrosit hasarıdır (171). Kinin ve benzeri maddelerin eritrosit yüzeyinin ozmotik geçirgenliğini bozmasıyla eritrositler kolayca lize olur (43). Bunun yanında şiddetli patogenezis; kısmen immunite, özellikle genç danaların dirençli olmasında etkili olan ve birçok hücre içi patojene karşı koruyucu immunitede rol oynayan interferon gama (IFN-γ), tümor nekrozis faktör alfa (TNF-α) ve nitrik oksit (NO)'i içeren mediatörlerle ilgilidir (172).

Patogenezisin temeli, eritrositlerdeki devamlı ve şiddetli parazitemi ve eritrosit parçalanması sonucu meydana gelen anemi ve anemik anoksidir. Anemi rejeneratif tipte olup, kan tablosuna bakıldığında retikülositler ve çekirdekli eritrositler görülür. Meydana gelen vazodilatasyon ve azalan kan dolaşımı sebebiyle, non-spesifik genel bir yangı tablosu oluşur (162, 163, 171). Azalan kan dolaşım hızı sebebiyle, bazı hayati organlarda anoksi meydana gelir ve parazitin toksik ürünleri ya da organlardan kaynaklanan metabolik ürünlerle genel bir organ tahribatı oluşur. Retiküloendotelyal sistem hücrelerinin özellikle de histiyositlerin; ölü, anormal eritrositleri ve çözünmüş fibrini uzaklaştırması yanında enfekte eritrositleri uzaklaştırmada da rolü vardır. Histiyositler, dalak ve lenf nodüllerinin sinüsleri ile karaciğerin sinüzoidlerini doldurarak bu organlarda hipertrofi ve hiperplazilere yol açarlar. Dalak ve lenf

yumruları, ödem ve hemoglobinemiye bağlı olarak büyümüş ve siyah renklidir. Hemolitik olaylara oldukça duyarlı olan böbreklerde, glomeruluslar ve renal tubuller hemoglobin ile doludur. Normal şartlarda renal tubullerden geri emilebilen hemoglobin, miktarın fazla olduğu durumlarda emilemeyerek idrara geçer. Böbrekteki hasar, hemolizin şiddetine bağlıdır. Akut olaylarda, böbrek büyümüş ve siyah renklidir. İdrar kesesi, kırmızı renkli idrarla doludur (43, 171).

Nekropside, konjuktivalar, yağlar ve deri altı bağ dokusunun anemik ve ikterik olduğu gözlenir. Seröz zarlarda peteşiyel kanamalar, vücut boşluklarında sıvı bulunabilir. Karaciğer ve dalakta büyüme meydana gelmiştir. Safra kesesi, koyu sarı-yeşil safra ile iyice doludur. İdrar kesesi; genişlemiş, duvarı incelmiş ve koyu renkli idrarla dolup gerginleşmiştir. Dalak sert kıvamlıdır; diseke edildiğinde pulpa kesit yüzünden dışarı taşar. Böbrekler koyu renklidir. Diğer organlarda konjesyon ve peteşiyel kanamalar gözlenir. Akciğer ve beynin etkilendiği durumlarda akciğerlerde peteşiyel kanamalar ve pulmoner ödem yanısıra beyin gri maddesinin pembe renk aldığı ve beyinde konjesyon olduğu görülür. Ayrıca epikardiyum ve endokardiyumda hemoraji olduğu ve merkezi sinir sistemi harabiyeti bu hastalıkta görülen patolojik bulgulardandır (19, 23, 43, 132, 170, 173-175).

2.8. BABESİOSİS'TE BAĞIŞIKLIK

Babesiosis'e karşı immun yanıt, doğal ve kazanılmış bağışıklığın aktif hücreleri tarafından gerçekleşir. Doğal bağışıklık mekanizmasında, spesifik olmayan (nonspesifik) komponentler mikroorganizmalara karşı ilk savunma basamağını oluştururlar. Kazanılmış bağışıklık sistemi ise, yabancı bir antijenle karşılaşıldığında uyarılan ve sadece o antijene özgü olarak gelişen, o antijenle bir kez daha karşılaşıldığında daha etkin bir şekilde cevap verilmesini sağlayan bir sistem olup, humoral ve hücresel savunma şeklinde ortaya çıkar. Hayvanlarda *Babesia* türleri ile doğal enfeksiyondan sonra, kuvvetli bir bağışıklık meydana gelmektedir. Enfeksiyon sırasında fagositozun artması, enfekte hücrelerin makrofajlar tarafından sindirilmesi ve enfekte eritrositlerin membran geçirgenliğindeki değişikliklere bağlı olarak antikorların eritrosit içine girmeleri sonucu etkenler yok edilebilmektedir. Fagosit hücrelerin sayısının, canlı organizmaları sindirmek için yeterli miktarda olması, korunmada önemlidir. Opsoninlerin mevcudiyeti ve makrofajların uyarılması ile korunma artmaktadır. İlk enfeksiyonda konağın canlılığını devam ettirebilmesinde en büyük

öneme sahip olan organ dalaktır (15, 176). *Babesia* taşıyıcı hayvanların dalağının çıkarılması, hastalığın klinik görülmesi ile sonuçlanır. Bu hastalıkta dalak, sadece antikor üretmez, enfekte olmuş eritrositleri de yok eder (177, 178). Enfeksiyonun tekrarlaması durumunda, bağışıklık sürekli olmaktadır. Hastalığı atlatan hayvanlarda enfeksiyondan sonraki altı ay için, güçlü bir bağışıklık devam etmektedir. Ancak bağışıklığın koruyucu etkisi bir yıl kadar bir süre sonra azalmakta ve enfeksiyona karşı tekrar duyarlılık oluşmaktadır. Endemik bölgelerde hayvanlar ilk enfeksiyonu atlattıktan sonra genellikle sonraki enfeksiyonlara karşı dirençli olmaktadırlar (179, 180). Bunun yanında profilaktik bir immunizasyondan sonra (aşılama gibi) *Babesia* türlerine karşı immunite gelişebilmektedir (30, 181). Öte yandan babesiosis'e karşı immunitede, patojenle ilişkili moleküler kalıplar (PAMPs) olarak adlandırılan motifleri tanıyan ve bunlarla bağlanabilen, doğal immunitenin uyarılmasını ve takiben kazanılmış yanıtın başlatılmasını sağlayan Toll-like reseptörler (TLR)'den TLR9 ve TLR11 sorumludurlar (182, 183).

Babesiosis tedavisi gören (örneğin imidocarb dipropionate ile) sığırlarda, aynı parazitin homolog suşlarına karşı yıllarca süren direnç görülürken, heterelog suşlara karşı korunmada enfeksiyon zorunludur (184, 185).

Babesiosis'e karşı dirençte, genetik ve hayvanın ırkı, yaş ve primer enfeksiyona veya re-enfeksiyona karşı şekillenen savunma biçimi gibi birçok faktör etkilidir (171, 186, 187).

Babesiosis'e karşı şekillenen direnç, ırklar arasında farklılık göstermektedir. *Bos taurus* ırkı sığırların *B. bovis* enfeksiyonlarına karşı, *Bos indicus* (Zebu) ırkı sığırlardan daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Ancak *B. bigemina*'ya karşı duyarlılığın her iki ırktaki sığırlarda benzer olduğu ifade edilmiştir. Genel olarak İngiliz ve Avrupa ırkı sığırlar babesiosis'e daha duyarlıdırlar. Yerli ve melez sığır ırkları ise daha dirençlidirler (21, 188).

Yaş, sığır babesiosis'inde önemli bir faktördür. Sığırlarda, doğumdan başlayarak 3'üncü ayda belirgin olan, 6'ıncı ayda en yüksek düzeye ulaşan, 9-12'inci aya kadar süren bir yaş direnci vardır (178). Enfeksiyonu daha önceden geçirmemiş annelerden doğan iki aylıktan küçük buzağılar, *B. bovis* ve *B. bigemina* enfeksiyonlarına karşı oldukça hassastırlar. Ancak bağışık olmayan anneden doğan buzağılarda da *B. bovis* ve *B. bigemina*'ya karşı direnç oluşabildiği bildirilmiştir (43). Enzootik bir bölgede enfekte

anneden doğan buzağılar kolostrumla antikorları (IgG) pasif olarak alırlar ve pasif bağışıklık kazanırlar. Bu nedenle her iki parazite karşı da dirençlidirler. Buzağılar iki aydan sonra en az 4-6 ay devam eden nonspesifik doğal dirençle korunurlar. Bu nonspesifik direnç, annenin immun yapısına bağlı değildir. Buzağıların yaşamında 6 ile 9 ay arasındaki dönem kritiktir. Bu dönemde *Babesia* enfeksiyonuna maruz kalırlarsa endemik sabitlik oluşur. Daha sonraki dönemlerde ortaya çıkan primer enfeksiyonlar ise öldürücü olabilir (20). Bu antikorlar yaklaşık 6 hafta göreceli bir koruma sağlar (189).

Babesiosis'te, her ne kadar klinik iyileşmenin ardından etkenler kandan uzaklaştırılsa da az miktarda etken kanda birkaç yıl varlığını sürdürür. Bu süre içerisinde parazit ve konak immun sistemi arasında bir denge oluşur. Preimmunite olarak tanımlanan bu denge, konağın immun sisteminde bir zayıflama olmadığı durumlarda reenfeksiyonlara karşı hayvanları korumada büyük öneme sahip olan antikorların üretimini sürekli uyarır. Preimmunisyon, protozoer hastalıklarda sık olarak rastlanan bir aktif bağışıklık şeklidir. Bu bağışıklık biçimi, ya akut enfeksiyonun atlatılmasından sonra veya uzun zaman aralığında azar azar enfeksiyöz ajana maruz kalma neticesinde oluşur. Endemik alanlarda hayvanları reenfeksiyonlara karşı korur. Ancak preimmun hayvanlar, uzun süre latent halde enfekte kaldıkları için vektör kenelerin yoğun olduğu alanlarda portör görevi görmektedir. *B. bigemina* enfeksiyonlarında bu latent durumun 12 yıla kadar çıkabildiği belirtilmiştir. Bu sebeple, babesiosis görülmeyen bölgelerden, enfekte bölgelere sokulan hayvanlar, bu enfeksiyona karşı yüksek hassasiyet göstererek kolayca enfekte olurlar. Preimmünisyon, babesiosis'e karşı koruyucu bağışıklıkta oldukça önemlidir. Preimmünisyonun etki ve süresi, enfeksiyonun şiddetine ve hayvanın reenfeksiyonlara maruz kalıp kalmamasına bağlıdır. Primer enfeksiyon ne kadar şiddetli seyreder ve hayvanlar reenfeksiyonlara ne kadar fazla maruz kalırsa preimmünisyon da o kadar kuvvetlenir ve süresi de artar (20, 23).

Babesia türlerinin antijenik varyasyonları çevresel bir uyarıma karşı veya spesifik bir antikora karşı gösterdikleri dirençte önemli bir role sahiptir. *Trypanosoma* türlerinde sıklıkla görülen yüzey antijenlerindeki varyasyon, *Babesia* türlerinde de görülür (190, 191). Bu yüzey antijenleri değişken bir özelliğe sahip olmalarının yanında antijenik bir spesifikliğe de sahiptirler. Yüzey antijenlerindeki farklılık *Babesia* türleri arasında olduğu gibi, aynı türün coğrafik suşları arasında da olabilmektedir. Bu nedenle babesiosis'e karşı mücadelede geliştirilmeye çalışılan aşılarda, hedef aşı antijenlerinin

söz konusu varyasyonaları dikkate alınarak konu üzerinde araştırmalar bu kapsamda hala devam etmektedir (192-194).

İmmunitede, hem sıvısal (humoral) hem de hücresel (cellular) faktörler görev alırlar. Başlangıçta immun sistem, etkili bir "primed" (güçlü immun aktivasyon) kazanır (178). Enfeksiyon konağa bulaştırıldığında sporozoitler, kısa bir müddet dolaşımda plazma içerisinde serbesttirler. Bu aşamada, immunoglobulin G (IgG), sporozoitlerin hedef hücrelere girmesinden önce onlara bağlanıp nötralize ederek enfeksiyonu engelleyebilir. Sporozoitler eritrositlere girdikten sonra ise yeni bir dönem başlar. Bu evrede parazitemi yükselir ve akut babesiosis görülebilir. Doğal immun sistem hücreleri, parazitin gelişme hızını kontrol ederek paraziteminin süresini belirler. Makrofajların ve NK hücrelerin yokluğunda, kısa süre içerisinde yüksek bir parazitemi gelişir. Paraziteminin engellenmesi, çözünebilir faktörlerin üretimiyle gerçekleşir. Bu faktörler; doğal katil hücreler (NK) tarafından salınan gama interferon (IFN-γ) ve makrofajlar tarafından üretilen alfa-tümör nekroz faktör (TNF-α), NO ve reaktif oksijen türleri (ROSs)'dir. Parazitemideki düşme, parazitlerin dejenerasyonu ve bunların dalak tarafından temizlenmesi ile sağlanır. Bu sırada enfeksiyon çözülme evresine girer ve hastalık, şiddetliden sakin döneme geçer. Hastalığın gerileme evresinde, parazitlerin ölümü için T lenfositleri, özellikle de $CD4^+$ (Cluster Designation 4^+) ve IFN-γ subpopulasyonları gereklidir (181).

2.8.1. Doğal Bağışıklık

Doğal bağışıklık, canlıları mikroorganizmalara karşı koruyan ve spesifik olmayan (nonspesifik) komponentler ile sağlanmaktadır. Doğal bağışıklıkta, çeşitli spesifik moleküllerin sorumlu olduğu ve özellikle NK hücrelerin ve makrofajların antibabesial aktivitede yer aldığı ortaya konmuştur (195). Bu hücrelerin yanı sıra, nötrofiller, T lenfositleri, trombositler, eozinofiller, mast hücreleri ve non-haemopoietik hücreler de doğal bağışıklığın gelişmesinde görev alırlar. Babesiosis'e karsı doğal bağışıklıkta rol oynayan hücrelerin yanı sıra, aktif makrofajlardan salgılanan IFN-γ, TNF-α, interlökin-12 (IL-12) ve ROSs gibi çözülebilir faktörler de doğal bağışıklığın elemanlarındandır (189).

Akut enfeksiyona yol açan *Babesia* suşlarına karşı doğal bağışıklık mekanizmasında IL-12 ve IL-10, önemli immunregülatör sitokinlerdir. Genç hayvanlara virulent *B. bovis*

suşu verildiğinde hemen koruyucu bağışıklık devreye girmekte ve dalakta, IL-12 ve IFN-γ'lerin sayısı artmaktadır. Buna karşın ölümden önce, yaşlı hayvanlarda belirgin bir antikor cevabı şekillenmemekte ancak, hem yaşlı hem de genç hayvanların dalaklarında $CD8^+$ T-hücrelerinde belirgin bir artış gözlenmektedir (187). Öte yandan, IFN-γ, tip-1 immun cevabın düzenlenmesinde önemli bir role sahip olup B hücrelerinde IgG_2'nin üretimini ve mononükleer fagositlerin (MP) aktivasyonunu sağlar. IgG_2, etkenin imhasını kolaylaştıran önemli bir izotiptir. IFN-γ ile TNF-α'nın uyardığı MP'de üretilen NO, MP'leri aktive eder ve fagositozu sağlar (196).

Doğal bağışıklıkta görev alan hücrelerin üzerinde, antijene ait yapıları tanıyan; endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olmak üzere üç gruba ayrılan reseptörler bulunmaktadır. Sinyal ileten reseptör grubunu Toll-like reseptörler (TLR) oluşturmaktadır. TLR, birçok patojene karşı doğal bağışıklığın oluşmasını sağlayan bir grup tip 1 transmembran proteinidir. Aynı zamanda kazanılmış bağışıklığın da aktive olmasını sağlayarak konak savunmasında çok önemli role sahiptir. Bunlar, patojenlerin tanınmasında, inflamatuvar ve immun sistem cevabının başlatılmasında oldukça önemlidirler. Çeşitli lökosit alt kümelerinde bulunan TLR'lerin görevi, değişik PAMP'lere (Pathogen-associated molecular patterns: patojene ilgili moleküler motifler) bağlanmaktır. TLR, patojene özel moleküller ile bağlandığında, bir dizi sinyal iletim yolağı aktive olur. Neticede doğal immun yanıt uyarılır ve kazanılmış immun yanıtın başlaması için gerekli olan antijen sunan hücrelerin sitokinler ve kostimülatör moleküller üretmesi sağlanır. Babesiosis'e karşı doğal immunitede, TLR'lerden CpG (TLR9) ve profilin (TLR11) önemli bir rol oynadıkları bildirilmiştir (181, 197, 198). *Babesia bovis* merozoit ekstraktlarının sığır PBMC (peripheral blood mononuclear cells) proliferasyonunu non-spesifik olarak aktive etmesi TLR9'un varlığından ileri gelir (182). Ayrıca *E. coli*'de olduğu gibi, *T. cruzi*, *T. brucei* ve *B. bovis'*te de aktive makrofajların IL-1β, IL-12, TNFα ve NO üretiminden sorumlu DNA, *B. bovis* lipid ve *Babesia* merozoit ektratlarında da gösterilmiştir (198-200). Hem sığırlarda TLR9'nin varlığını ortaya koyan çalışmada (183) hem de yukarıda bahsi geçen çalışmalarda (198-200) TLR9'un fonksiyonel olduğu gösterilmiştir. *Toxoplasma gondii* ve diğer protozoonlarda identifiye edilen TLR11, IL-12 üretimini sağlayan bir proteindir (201). *Babesia bovis* Texas suşu (T_2Bo)'nun genomik sekansının homolog genleri için yapılan parçalamada, 17,5 kDa'luk profilin benzeri bir protein identifiye edilmiş ve bunun *P.*

falciparum, *T. gondii* ve *T. parva* profilleri ile %34-64 identik olduğu saptanmıştır. Ancak, aynı şartlarda ne *Cryptosporidium parvum* ne de rekombinant *B. bovis* TLR11'leri, sığır APC (activated protein C)'siyle IL-12 üretimini stimule etmezken; *B. bovis* DNA ve *E. coli* DNA TLR11'leri IL-12 üretimini stimule etmiştir (198, 200). İlginç olarak TLR11, insan hücrelerinde bulunmadığı gibi (202), kedi, köpek ve şempanzenin de aralarında bulunduğu çeşitli memelilerde de (203) eksprese edilememiştir. Bu sebeple, protozoon enfeksiyonlarında non-murine memeli immun yanıtında apikompleksal TLR11'lerin rolü halen bilinmemektedir (198).

2.8.2. Kazanılmış Bağışıklık

Babesiosis'e karşı kazanılmış bağışıklıkta hem humoral hem de hücresel faktörler yer almaktadır.

2.8.2.1. Humoral İmmun Yanıt

Babesia enfeksiyonlarında humoral bağışıklığın önemi sınırlıdır (181). Antikorların plazmada serbest haldeki parazitler üzerine olan etkileri, eritrosit içerisindeki parazitlere göre daha fazladır. Bu yüzden, antikorların koruyucu rolleri, parazitlerin kan dolaşımına ulaştıkları zaman ile hedef hücrelere girdikleri zaman arasında geçen süreyle sınırlıdır. Bu evrede IgG'ler sporozoitlere bağlanarak hedef hücrelere girmelerini engellerler. Sporozoitlerin eritrositlere penetrasyonu, alternatif komplement sistemin aktivasyonunu sağlarken, eritrositlerdeki *Babesia* antijenleri de antikor üretimini teşvik ederler. Antikorlar, eritrositleri opsonize ederek fagositik hücreler (dalak orijinli makrofajlar) tarafından yok edilmelerini kolaylaştırırlar (204). Fagositoz, başlangıçta nonspesifikken ileri dönemde opsonizasyona bağlı olarak spesifik hale geçer (205, 206). *Babesia* türleri, humoral immun yanıtı alt edebilir ve onu kendi yararına göre değiştirebilirler. *Babesia bigemina* enfeksiyonunda, konak eritrosit yüzeyinde bulunan bir parazit proteini, IgM'yi bağlar ve bu bağlanma parazitin gelişmesi ve hayatta kalmasında yararlı olur (207). Komplement sistem ile olan ilişkilerde de benzer bir taktik söz konusudur. Komplement ile *Babesia* türlerinin lize edildiği tespit edilememişse de *B. rodhaini*'nin eritrositlere invazyonunda, komplement sistemin çeşitli unsurlarının esas olduğu görülmüştür (38). Ayrıca *B. rodhaini* merozoitlerinin fagositozisini artırmak için komplement kullanılan bir çalışmada komplementin, umulmadık şekilde patojenin fagositozisini inhibe ettiği görülmüştür (208).

2.8.2.2. Hücresel İmmun Yanıt

Babesiosis'e karşı dirençte hücresel immunitenin rolü, konağın savunma sisteminde dalağın öneminin fark edilmesiyle ortaya çıkmıştır (177, 181). Dalak; T, B ve NK hücreleri ile makrofajların yer aldığı büyük bir lenfoid organdır. Bu hücre populasyonlarının bazıları koruyucu etkiden sorumludurlar. Bağışık hayvanların dalak hücrelerinin, *Babesia* ile enfekte farelere transfer edilmesiyle fareleri enfeksiyona karşı korumak mümkündür (209). Bundan başka, iyi seviyelerdeki korumanın lenf yumrusu hücreleriyle değil de, özellikle dalak hücreleri tarafından sağlanması, sistemik olarak antijenlerin muhtemelen perifer lenf yumruları yerine tercihen dalağa yönlendirildiğini yansıtır (210). T hücrelerinin spesifik rolü, timus-yetersiz hayvanlar kullanılarak araştırılmıştır. Timussuz farelerin *B. microti* ile konjenital enfeksiyonunda, yüksek inatçı bir parazitemiye karşılık normal farelerde geçici parazitemi saptanmıştır (210, 211). Bu veriler, T hücrelerin babesiosis'e karşı dirençte kritik öneme sahip olduğunu ve ayrıca enfeksiyonun çözülme döneminde de T hücre aracılı mekanizmaların rol aldığını gösterir (210). Keza T hücreleri, öldürücü *Babesia* türlerine karşı korunmadan da sorumludurlar. *B. rodhaini*'ye karşı bağışık farelerde, antitimosit serum verildiğinde parazitemide yükselme ve yüksek mortalite görülür (212). Öte yandan immun hayvanlardan elde edilen saflaştırılmış T lenfositlerinin enfeksiyonla karşılaşmamış (naive) farelere nakli, *B. microti*'ye karşı immunite oluşturmada (210); immun yetersiz farelere immun timusitlerin edinsel transferi ise *B. microti* enfeksiyonunu ortadan kaldırma kabiliyeti kazandırmada yeterlidir (213). *B. microti* antijenleri, T hücrelerinin spesifik aktivasyonunu tetikleyebilir. Serbest merozoitlerde olduğu gibi enfekte eritrositler de, fareleri gecikmiş hipersensitiviteye duyarlı hale getirirler (214). $CD4^+$ T hücreleri azalmış farelerin, *B. microti* enfeksiyonuna karşı normal farelerden daha duyarlı oldukları; $CD8^+$ sitotoksik T'lerin azaldığı farelerde ise bu duyarlılığın artmadığı, tersine azaldığı ve bu yüzden *B. microti* enfeksiyonuna karşı korumada başlıca sorumlu subpopulasyonun $CD4^+$ T hücreler olduğu ileri sürülmektedir (215, 216). Buna karşın ABD'de hasta bir insandan izole edilen (217), patojenitesi ve öldürme gücü (%100) itibariyle *B. bovis*'e iyi bir model kabul edilen WA1 *Babesia* suşu ile farelerde oluşturulan enfeksiyon, $CD8^+$ T hücrelerince üretilen IFN-γ ve $\gamma\delta$T hücrelerince üretilen TNF-α ile karakterize bulunmuştur (218). Öte yandan TNF reseptör yetersiz farelerde WA1 *Babesia* enfeksiyonun daha hafif seyrettiği ve farelerin %90'nın hayatta kaldığı gözlenmiştir. Takiben genetiği değiştirilmiş farelerde

(knockout mice) yapılan deneyde, akut WA1 *Babesia* enfeksiyonu gözlenmiş; IL-12, IFN-γ ve NO'in koruyucu rol üstlendikleri; bu enfeksiyonda ne B hücreleri ne de $CD4^+$ T hücreleri immuniteye katkı sağlamazken, NK hücreler ve makrofajlar önemli bulunmuştur. Bu veriler, WA1 *Babesia* suşuna karşı doğal immunutenin, kazanılmış bağışıklığın gelişimi ve enfeksiyonun kontrolünde kritik öneme sahip olan IL-12 ve IFN-γ aracılığı ile makrofaj aktivasyonunu ve NO üretimini kapsadığını gösterir (219).

Genelde immun hücre aktivasyonunun babesiosis'e karşı koruyucu olduğunun görülmesine karşın, bazı güçlü immun hücre populasyonlarının hastalığın patogenezisinde de görev alma olasılığı vardır. Bu olasılık, öldürücü *B. rodhaini* suşu ile challenge edilen immun sistemi baskılanmış farelerin, tedavi edilmeyen immun yeterli (immunocompetent) farelere göre hayatta daha fazla kalmalarıyla desteklenmiştir (220).

2.9. BABESİOSİS'TE TEŞHİS

Klinik semptomlar başta olmak üzere, mevsim, kene enfestasyonu, unstabil bölge gibi epidemiyolojik veriler, babesiosis'i düşündürse de kesin teşhis için mutlaka farklı tekniklerin kullanıldığı uygun testler yapılmalıdır. Hastalığın ortaya çıktığı zamandan beri tanı amacıyla kullanılan en yaygın yöntem mikroskobik teşhistir. Mikroskobik teşhis, perifer kandan yapılmış ve Giemsa ile boyanmış preparatların mikroskop altında incelenmesi sonucu eritrositler içerisinde parazitin görülmesiyle konmaktadır. Hastalığa hangi türün yol açtığını belirlemek için ise daha çok parazite karşı oluşan spesifik antikorların serolojik yöntemlerle (IFAT, ELISA vb.) saptandığı veya parazit DNA'sının moleküler yöntemlerle (PCR, RLB, Nested-PCR, Real Time PCR vb.) tespit edildiği testler uygulanmaktadır (171, 221). Bunun yanında son zamanlarda Japonya'da immunochromatographic test (ICT) adı verilen hızlı ve basit bir strip serodiagnostik test ile de teşhis yapılabilmektedir. Uzman olmayan kişilerin dahi kolaylıkla kullanabileceği bu strip test, nitroselüloz membran tabanlıdır. Söz konusu test ile teşhis, membran üzerine *B. bovis* (rap-1), *B. bigemina* (rap-1), *T. equi* (EMA-2t) ve *B. caballi* (Bc48)'ye ait rekombinant proteinlerin emdirilip membran üzerine şüpheli hayvana ait bir damla kan (antikor) damlatılmasıyla konmaktadır (222).

2.9.1. Mikroskobik Teşhis

Mikroskobik teşhis, hasta hayvanlardan tekniğine uygun olarak alınmış kan örneklerinden ince yayma veya kalın yayma preparatlar hazırlanması suretiyle uygulanmaktadır. *Babesia* etkenlerini içeren eritrositlerin kapillar damarlarda birikme eğiliminde olmalarından dolayı *vena jugularis* yerine, kapillar damarların geçtiği kuyruk ucu veya kulak ucundan alınan kan, temiz bir lam üzerine damlatılarak ince veya kalın yayma frotiler hazırlanmaktadır. İnce yayma frotiler, metil alkolde 5 dakika, kalın yayma frotiler ise 100 ^{o}C'de 15 dakika tutularak tespit edildikten sonra Giemsa ile boyanarak mikroskopta immersion objektifi altında incelenmektedir. Eritrositler içerisinde parazitin görülmesiyle teşhis konulmaktadır. Ölüm sonrası yapılan muayenelerde kandan veya dalak, karaciğer, kemik iliği gibi organlardan hazırlanan sürme preparatlarla da teşhis yapılabilmektedir (23, 164, 223, 224). *Babesia bovis* ve *B. bigemina* enfeksiyonlarının cerebral formunda nekropside genellikle beyinden alınan frotilerden de yararlanılmaktadır (23, 225). Söz konusu yöntemler, hem ucuz hem de pratik olması nedeniyle kolaylıkla uygulanabilmektedir. Ancak her iki yöntemle yapılan frotilerde de lam ve lamellerin temiz olmasına, boyama solüsyonunun dikkatli hazırlanmasına özen gösterilmelidir. Çünkü deneyimli olmayan personel tarafından yapılan incelemelerde toz partikülleri ile etkenler bazen karıştırılabilmektedir (23, 164, 223, 224).

Paraziteminin çok yoğun olduğu durumlarda etkenlerin morfolojilerinin daha sağlıklı teşhis edilebilmesi amacıyla ince yayma froti yöntemi kullanılmaktadır. Bunun için çok az miktarda kan temiz bir lam üzerine damlatılarak froti hazırlanmaktadır. Kalın yayma froti yöntemi ise paraziteminin düşük olduğu durumlarda tercih edilmektedir. Kalın damla kan preparatlarıyla daha fazla hacimde kan incelenir (23, 164, 223, 224). Her iki yöntemle yapılan inceleme esnasında tüm saha dikkatle incelenmelidir. Asgari 200 mikroskop sahasının incelenmesi esasına dayanan bu durum çok sayıda inceleme yapılmasını gerektiren durumlarda oldukça zaman almaktadır. Her iki yöntemle de yapılan mikroskobik incelemelerde etkenlerin görülmesi enfeksiyonun varlığının göstergesidir. Fakat bazı durumlarda (hastalığın çok erken dönemi veya kronik dönem) frotilerde etkenler görülemeyebilir. Etkenin frotilerde görülememesi enfeksiyonun hayvanda kesinlikle olmadığı manasına gelmemektedir (223, 224). Mikroskobik bakıda pozitif bulunan hayvanlarda paraziteminin hesaplanmasında; en az 50 mikroskop

sahasındaki enfekte olan ve enfekte olmayan eritrositler sayılır. Bulunan rakamların ortalaması 4 ile çarpılarak 200 mikroskop sahasındaki sayılar bulunur. Parazitemi (%)= Enfekte eritrosit sayısı/Enfekte olan+enfekte olmayan eritrosit sayısı x100 formülü ile hesaplanmaktadır.

2.9.2. Serolojik Teşhis

Doğal veya deneysel babesiosis'e karşı oluşan antikorların tespit edilmesinde kullanılan immunodiagnostik metotlar başlıca; Indirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT), Enzim Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), Direkt Fluoresan Antikor Testi (FA), Indirekt Hemaglutinasyon (IHA), Kard Aglutinasyon (KA), Komplement Fikzasyon Testi (CFT), Serum Kard Testi (KT), Gel Presipitasyon (GP), Latex Aglutinasyon Testi (LAT), Radio Immuno Assay (RIA), Bentonite Aglutinasyon Testi (BAT), Serum-Slide Aglutinasyon Testi (SAT) ve Slide Enzim Linked Immuno Sorbent Assay (SELISA)'dir (15, 20, 23, 125, 165, 166, 226-228). Akut babesiosis'li hayvanların eritrosit, serum veya dokularından hazırlanan antijenlerin kullanıldığı bu testler, subklinik seyirli hayvanların serumlarında antikor aranması tekniğine dayanmaktadır. Parazit antijenlerine karşı antikor aranmasının yanında parazit antikorlarına karşı antijen aranması da mümkündür. Akut enfeksiyonu atlatan hayvanlar, hastalığa ait klinik belirti göstersin veya göstermesin kanlarında etkenler uzun süre varlıklarını devam ettirebilmektedirler. Latent enfekte" veya "taşıyıcı" olarak nitelendirilen bu hayvanlar, vektör kenelerin de varlığında, diğer duyarlı hayvanlar için enfeksiyon kaynağı olabilmektedirler. Bu tip hayvanlarda etkenin teşhis edilebilmesi için çeşitli serolojik ve moleküler teknikler kullanılmaktadır. Serolojik tekniklerle genellikle etkene özel antikorlar aranarak, hastalığın indirekt teşhisi yapılmış olmaktadır. Ancak bazı olgularda hayvanın kanında etken olmasa bile antikorların varlığı devam edebilmekte ve serolojik testlerin yanlış pozitiflikler verebilmektedir. Bunun yanında bazı *Babesia* türleri arasında çapraz reaksiyonların şekillenebildiği de yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (18, 23, 223, 229).

Serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllükleri, kullanılan antijenin hazırlanmasına bağlıdır. Serolojik testlerin çoğunda, kullanılan antijenlerin esas kaynağını, yüksek parazitemi derecesinde bulunan enfekte hayvan kanı oluşturmaktadır. Parazitemi oranı %2'den az olan kandan hazırlanan antijenin, Komplement Fikzasyon Testinde zayıf reaksiyon verdiği bildirilmiştir (15, 170).

Babesiosis'in serolojik olarak teşhisinde ilk olarak kullanılan test, CFT testidir. Fakat bu testin duyarlılığı düşüktür (230, 231). Bu teste göre duyarlılığı ve güvenilirliği daha fazla olan IFA testi babesiosis'in teşhisinde en sık kullanılan serolojik testlerdendir. Ancak bu testte *Babesia* türleri kendi aralarında çapraz reaksiyonlar verebilmektedir (232-234). Serolojik yöntemlerden ELISA testi de oldukça duyarlı ve etkili bir testtir. Bu test ile bir seferde çok miktarda örnek incelenebilmektedir. Bununla birlikte, testte antijen kalitesi testin duyarlılığını etkilemektedir. Enfekte eritrositlerden hazırlanan antijenler, konak eritrositleri ile kontamine olduklarından, anti-eritrositik antikorlar sebebiyle yanlış sonuçlara sebep olmaktadır. Bu sorunun önüne geçebilmek için saflaştırılmış rekombinant antijenler kullanılmaktadır (64, 82, 235).

2.9.3. Moleküler Teşhis

Babesiosis'te nükleik asit tabanlı moleküler tanı yöntemlerinin kullanılması, duyarlı ve özgün bir teşhise olanak sağlamaktadır. Moleküler biyolojik tekniklerin geliştirilmesiyle son konak ve vektörde parazite ait DNA veya RNA'nın varlığını ortaya koymaya yarayan PCR (Polymerase Chain Reaction), Multiplex PCR, Nested PCR, Reverse Transcriptase PCR, Real-Time PCR, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) PCR, RLB (Reverse Line Blotting) gibi moleküler testler babesiosisin teşhisinde sıklıkla kullanılmaya başlamıştır. Söz konusu bu teknikler, sahip olduğu yüksek sensitivite ve spesifitenin yanında kantitafif analize olanak sağlamaları, tam otamasyonla çalıştıkları için kontaminasyon riskinin çok daha düşük olması ve hızlı sonuç vermeleri gibi çeşitli özelliklerinden dolayı diğer yöntemlere kıyasla daha güvenilir olarak kabul edilmektedir (223, 224, 236, 237).

Nükleik asit tabanlı moleküler teknikler ile immun sistemden bağımsız veya atlatılmış enfeksiyonlardan etkilenmeksizin konak vücudunda çok az miktarda etken olsa dahi direkt hastalığa neden olan türlerin teşhisleri yapılabilmektedir. Bu moleküler yöntemlerle hastalığa neden olan parazit türlerinin eş zamanlı olarak teşhisleri de yapılabilmektedir. Ancak her yöntem gibi bu moleküler yöntemlerin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemler ekonomik olarak pahalı ve çok aşamalı yöntemler olup, inhibitörleri nedeniyle yanlış negatiflikler verebilmekte ve kontaminasyona bağlı yanlış pozitiflikler de gösterebilmektedir (223, 224, 236).

Bu yöntem, hedef organizmanın genomundaki, özgül bir DNA dizilimini, tekrarlayan şekillerde, binlerce kez çoğaltarak, kolaylıkla tespit edilebilir hale getirmektedir. PCR'ın

modifiye edilmesiyle birlikte; PCR ürününün daha spesifik primerlerle ikinci kez PCR'ını kapsayan Nested PCR (238), birden fazla primer çifti kullanılarak tek reaksiyonda birçok hedef bölgenin aynı anda çoğaltılmasını sağlayan Multiplex PCR (239, 240), kantitatif olarak parazit DNA'sının miktarını tespit eden ve dolayısıyla varlığını ortaya koyan Real-Time PCR (241), bir testte eş zamanlı olarak çok sayıda hastalık etkeninin tespit edilmesine olanak sağlayan RLB (150, 151, 161), parazitin RNA'sının tespitine yönelik yapılan Reverse Transcriptase PCR (242, 243) testi gibi testler geliştirilmiştir. Moleküler teşhis yöntemleriyle birlikte tespit edilen parazit türlerinin çeşitli gen bölgelerine göre moleküler karakterizasyonları yapılmakta ve Dünya'nın çeşitli bölgelerindeki aynı tür parazitlerle akrabalık dereceleri saptanmaktadır. RLB, Nested PCR ve Real-Time PCR hem laboratuvar analizlerinde hem de bilimsel çalışmalarda teşhis ve araştırma amacıyla Türkiye'de ve Dünya'da sıklıkla kullanılmaktadır (40, 101, 150, 154, 244-246).

RLB yöntemi, PCR ürünlerinin bir membranda ayrı sıralara bağlanmış özgün problara hibridizasyonu esasıyla çalışmaktadır. Teknik birçok etkeninin aynı anda bir çok prob ile karşılaştırılmasına imkan sağladığından oldukça pratik ve kullanışlı olarak ortaya çıkmaktadır. Sahip olduğu avantajları sebebi ile son yıllarda dünyada ve Türkiye‟de sığır babesiosis'inin teşhisinde yaygın olarak kullanılan bu teknikte DNA miktarının düşüklüğü ve hedef bölgenin büyüklüğüne göre yalancı negatiflikler ve soy düzeyinde pozitiflik saptanmasına karşın tür yalancı negatiflikleri gibi dezavantajlar ortaya çıkabilmektedir (247, 248).

Nested PCR yöntemi, standart PCR'a farklı primer takımlarıyla ikinci bir amplifikasyon uygulanması esasına dayanan moleküler bir tekniktir. İlk amplifikasyonda elde edilen ürün ikinci PCR aşamasında kalıp olarak kullanılır. Kullanılan ikinci primer takımı hedef diziye özgüdür. Kompleks mikrobiyal popülasyonlara ait hedef dizilerin spesifik bir şekilde amplifikasyonu klasik PCR yöntemleriyle bazen mümkün olmadığı görülmekte ve oluşan non-spesifik fragmentlerin amplifikasyonu sonucu yanlış pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Nested PCR ile söz konusu bu olumsuzluk giderilebilmekte, aynı zamanda düşük DNA'ya sahip örneklerin ikinci kez PCR uygulaması ile teşhisleri mümkün olabilmektedir (248, 249).

Son yıllarda ruminant ve vektör kenelerde babesiosis'in spesifik teşhisinde nested PCR yönteminin sıklıkla uygulandığı görülmektedir (248, 250, 251).

Real-Time PCR, PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji yabancı yayınlarda "kinetik PCR", "homojen PCR", "kantitatif Real-Time PCR" gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (252).

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını, patojenleri ve DNA hasarını belirleme, metilasyon tespiti, SNP (single nucleotide polymorphisms) analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur (253).

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında SYBR Green I ve Etidyum Bromid yöntemi, DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında floresan işaretli problar kullanılır. Bu tekniklerin başında TaqMan prob, molecular beacon, FRET (fluorescence resonance energy transfer), hibridizasyon prob ve Scorpion primer gibi floresan işaretli problar kullanılarak yapılanlardır (253). Son yıllarda Real Time PCR tekniğinin sığırlarda babesiosis'in araştırılmasında da kullanılmaya başladığı görülmektedir (241, 247, 253).

Nükleik asit tabanlı teknikler, teşhiste farklı sensitivite ve spesifite gösterebilmektedirler. Son yıllarda bu farklılık üzerine çeşitli çalışmalar yapılmış ve söz konusu bazı teknikler karşılaştırılarak hangi yöntemin daha hassas olabileceği yönünde bulgular elde edilmeye çalışılmıştır (148, 254-256). Yıldırım ve ark. (148) yaptıkları bir çalışmada, sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina*'yı Real Time PCR, Nested PCR ve RLB teknikleri ile karşılaştırmalı şekilde araştırmışlar, Real Time PCR yönteminin Nested PCR ve RLB tekniklerine oranla daha duyarlı olduğunu saptamışlardır. Bunun yanında her üç tekniğin de bu enfeksiyonların teşhisinde oldukça spesifik olduğunu tespit etmişler ve Nested PCR ile RLB testlerinin sensitivitelerinin de oldukça yüksek olduğunu ve teşhiste güvenli bir şekilde kullanılabilecekleri belirtilmiştir. Aynı araştırıcılar, Real Time PCR tekniğinin, sahip olduğu yüksek sensitivite ve spesifiteyle birlikte, eş zamanlı ve hızlı teşhise imkan sağlamasının yanında kantitasyona olanak vermesi ve bu sayede paraziteminin saptanabilmesi, dolayısıyla tedavi etkinliğinin takibi ve kontaminasyon riskinin minimize olması gibi avantajları ile öne çıktığını bildirmişlerdir.

2.10. BABESİOSİS'İN TEDAVİSİ

Babesiosis'in tedavisinde öncelikle seçilen ilacın etkinliği ve konak için ilacın toksisitesi göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca konakta kullanılan bir ilaç için dozajın terapötik ve toksik düzeyleri arasındaki ilişki de iyi bilinmelidir. Bu kapsamda kullanılan ilaçlar, yüksek miktarda kolinesteraz ihtiva eden etkenlere karşı genellikle kolinesteraz inhibitörü olarak uygulanmıştır (15, 18). Bu amaçla, geçmişten günümüze kadar, tedavi amaçlı etken maddesi farklı birçok ilaç kullanılmıştır. Bunlardan quinuronium türevleri (Acaprin, Babesan, Pirevan, Piroparv, Piroplasmin) 1ml/50 kg dozunda (15, 165, 180), diminazen aseturat (Babenil, Berenil) kas içi veya deri altı yolla 3,5 mg/kg dozda kullanılmıştır (165, 180). Acridin türevleri (Gonacrin, Acriflavin, Flavin, Euflavin, Tripaflavin) ise %0,5-2,5'luk çözeltileri koyun ve keçilerde 50-150 mg dozda damar içi yolla kullanılmıştır (15, 165, 257). Ancak ilaçların birçoğunun farklı zamanlarda kullanılmaları yasaklandığı için 1970'ten sonra günümüzde sadece imidocarb dipropionate kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde de tedavi bu ürün ile yapılmaktadır (171, 221).

Imidocarb, karbanilid türevi olup dipropionate halinde bulunması nedeniyle Imidocarb dipropionate ismiyle anılmaktadır. Babesiosis'e karşı hem terapötik hem de profilaktik amaçla kullanılan bu ilaç, etkeni doğrudan etkilemektedir. Poliaminlerin şekillenmesi veya kullanılması ile etkeni taşıyan eritrositlere inozitolun girişini engellenmektedir. Ayrıca hücre çekirdeğinin sayısı ve büyüklüğünde artış ile de sitoplazmada vakuoller şekillendirmektedir (171, 258-260).

İlacın ruminantlardaki tedavi dozu 1,2 mg/kg olup, kullanıldıktan kısa bir süre sonra kandaki bütün *Babesia* etkenleri etkisiz hale getirilmektedir. Koruyucu doz ise 2,4 mg/kg olup, koruyuculuk süresinin iki ay kadar olabileceği belirtilmektedir. (15, 165, 180). Imidocarb dipropionate'ın doğrudan zararlı bir yan etkisi olmamasına rağmen sığırlarda bazen 1mg/kg dozda zehirlenmelere yol açabileceği belirtilmiştir. Bunun yanında doz aşımına bağlı olarak (2 mg/kg dozda) sığırlarda öksürük, kas titremeleri, tükürük salgısında artış, sancı gibi kolinerjik belirtiler de meydana gelebileceği ancak söz konusu belirtilerin tehlikeli olmayıp geçici nitelikte olduğu ve ilacın verilmesini takiben 1 saat içinde kendiliğinden kaybolabildiği belirtilmiştir. İlacın 3-5 mg/kg dozlarda verilmesiyle söz konusu yan etkilerin şiddetli bir biçimde ortaya çıktığı ancak yine geçici olduğu ifade edilmiştir. 10 mg/kg dozlarında ise hayvanlarda ölüm

görülebilmektedir. Öte yandan yapılan araştırmalar sonucu ilacın karsinojenik olabileceği de belirtilmiştir (259).

Imidocarb dipropionate, damar içi (IV) yolla kullanılmamalıdır. İlaç verilen hayvanların doku ve organlarında 5,5-6 ay süreyle kalıntılarına rastlanmaktadır. Bu sebeple, süt veren hayvanlarda ve besi hayvanlarında kullanmaktan kaçınmalı, kullanıldığında ise hayvanlar ilaç uygulamasının üzerinden 28 gün geçmeden kesilmemelidir. Bu süre 90 güne kadar da uzatılabilmektedir (259, 261).

Tek tırnaklıların (262, 263) ve karnivorların (264) tedavisinde de imidocarb grubu ilaçlar ve diminazene aceturate kullanılmakta olup köpeklerde ayrıca trypan blue enjeksiyonu da başarılı olmaktadır. Yine köpeklerde atovaquone ve azithromycin kombinasyonunun da istenilen tedaviyi gerçekleştirdiği belirtilmiştir (265). Bunların yanında son zamanlarda yapılan çalışmalarda babesiosis'in tedavisinde epoxomicin'in başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (250). İnsanlarda ise tedavi amacıyla atovaquone, chloroquine, quinine, clindamycin ve azithromycin kombinasyonları kullanılmaktadır. Bunun yanında destek tedavisi de uygulanmaktadır (171, 266-268).

Türkiye Cumhuriyeti Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğünün 2016 yılında Türkiye'de sığırlarda babesiosis'in tedavisinde kullanılan ruhsatlı imidocarb dipropionate preparatları Tablo 2.1’de sunulmuştur (269).

Tablo 2.1. Türkiye'de sığırlarda babesiosis tedavisi için kullanılan ruhasatlı ilaçlar

Sıra No	İlaç Adı	Ruhsat Sahibi Firma	Etken Madde	Farmakolojik Şekli	Uygulama Şekli	Raf Ömrü	Ruhsat No
1	ACAPRİN %12	Bayer	120 mg Imidocarb dipropionate	Çözelti	Enjeksiyonluk	36 Ay	009/0845
2	AKMİZOL	Aksu Eczacılık	120 mg Imidocarb dipropionate	Çözelti	Enjeksiyonluk	24 Ay	021/0006
3	BABEDIF	Ceva	120 mg Imidocarb dipropionate	Çözelti	Enjeksiyonluk	24 Ay	020/0079
4	CARBAK	Rumeli İlaç	120 mg Imidocarb dipropionate	Çözelti	Enjeksiyonluk	24 Ay	019/0056
5	IMOZAN	Provet	120 mg Imidocarb dipropionate	Çözelti	Enjeksiyonluk	24 Ay	014/0033
6	İMİCARP	Teknovet	120 mg Imidocarb dipropionate	Çözelti	Enjeksiyonluk	24 Ay	018/0077
7	İMİDOVA	Icb Çukurova	120 mg Imidocarb dipropionate	Çözelti	Enjeksiyonluk	24 Ay	023/0048
8	İMİDOVİL	Vilsan	120 mg Imidocarb dipropionate	Çözelti	Enjeksiyonluk	24 Ay	018/0019
9	İMİZOL	Ceva	120 mg Imidocarb dipropionate	Çözelti	Enjeksiyonluk	24 Ay	010/0028
10	İMOCEL	Çelikler	120 mg Imidocarb dipropionate	Çözelti	Enjeksiyonluk	24 Ay	019/0066
11	KANAPRİM	Alke	120 mg Imidocarb dipropionate	Çözelti	Enjeksiyonluk	36 Ay	017/0061

2.11. BABESİOSİS'DEN KORUNMA VE KONTROL

Babesiosis'e karşı koruyucu önlemlerin alınması hastalıkla mücadelede büyük önem arz etmektedir**.** Koruyucu önlemlerin başında vektör kenelerle mücadele gelmektedir. Ayrıca, preimmunizasyon ve aşılama da hastalıktan korunma ve kontrolde uygulanan önemli yöntemlerdendir (18, 23, 270).

2.11.1. Vektör Kenelerle Mücadele ve Kene Kontrolü

Türkiye, sahip olduğu subtropikal iklimi ve coğrafik yapısı nedeni ile birçok kene türünün bulunduğu bir ülkedir. Bu nedenle kene kaynaklı vektör-borne hastalıklar bu coğrafya da oldukça yaygın bir şekilde görülmektedir. Bu hastalıkların en önemlilerinden biri olan babesiosis, özellikle kenelerin aktif olduğu mevsimlerde sığır ve koyunlarda verim kayıplarının yanı sıra ölümlere neden olmakta ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu sebeple keneler yoluyla bulaşan hastalıklara karşı uygulanabilecek en etkin koruma yöntemlerinin başında vektör kenelerle mücadele ve kene popülasyonunu kontrol altına alma uygulamaları gelmektedir (270).

Vektör kenelerin eradikasyonu mümkün değildir. Bu nedenle kenelere karşı ancak mücadele stratejileri geliştirilip uygulanabilmektedir. Bu amaçla öncelikle bölgedeki kene faunası tespit edilmeli ve bu kenelerin biyo-ekolojik özellikleri araştırılmalıdır. Kene mücadelesi çeşitli akarisidlerle yapılabileceği gibi virus, bakteri, protozoon, nematod, mantar gibi çeşitli biyolojik ajanlar ve kene aşılarıyla da yapılmaktadır (185, 271, 272).

Kenelerle mücadele, genellikle konak hayvanların ve çevrenin düzenli aralıklarla akarisid ilaçlarla ilaçlanması esasına dayanmaktadır. Ancak akarisid kullanımı oldukça zahmetli ve masraflı olup, aynı zamanda çevre açısından da risk oluşturmaktadır (167). Keneler genellikle tarım ve orman alanları içinde yayılmış durumda olduklarından yapılan ilaçlamalar çevreye de zarar vermekte ve parazit olmayan diğer canlıları da etkilemektedir. Ayrıca keneler, konak üzerinde olmadıklarında çok iyi bir şekilde gizlenmekte ve dolayısıyla akarisid ilaçların etkisinden kurtulabilmektedirler. Bunun yanında sık kullanılan akarisidlere karşı oluşan direnç yine kenelerin bu ilaçların etkilerine karşı duyarsız olmalarına sebep olmaktadır (270). Bu nedenlerden dolayı konak hayvanın ilaçlanması kenelerle mücadelede daha etkili bir yöntem olarak

görülmektedir. Türkiye'de özellikle ilkbahar mevsiminde meraya çıkacak hayvanlara koruyucu amaçla veya hayvanların üzerindeki keneleri uzaklaştırmak için banyo ve püskürtme yoluyla çeşitli akarisidler kullanılmaktadır (173).

Babesiosis'e karşı korunmada kene kontrolü büyük önem taşımasına rağmen, akarisidlerin pahalı oluşu, bazılarına karşı direnç şekillenmesi, uygulama sırasında hayvan hareketleri ile ilgili düzenlemelerin ve karantinanın tam olarak yapılamaması ve birçok işletmede akarisidlerin banyo veya püskürtme şeklinde uygulanacağı sistemlerin genellikle yetersiz olmasından dolayı, daha güvenilir kontrol metotlarının uygulanması gerekmektedir. Bu nedenle, korunmada etkili bir aşının gerekliliği son yıllarda daha da önem kazanmıştır (273). Özellikle kene aşılarıyla yapılan çalışmalar sonucu, *B. microplus*'un Bm86 geninden elde edilen ticari aşıların (Gavac^{TM}, TickGARD^{PLUS}), kenelerin sayısında, doyma ağırlıklarında ve fertilite oranlarında önemli derecede azalma sağladığı tespit edilmiştir (274, 275). Bu ticari aşıların *R. annulatus, R. decolaratus, Hyalomma anatolicum* ve *H. dromedarii*'ye karşı koruyuculuk sağlarken, *Amblyomma variegatum, A. cajennense* ve *R. appendiculatus*'a karşı koruyuculuk sağlamadığı bildirilmiştir (272). Bunun yanında *Ixodes scapularis*'in subolesin olarak adlandırılan 4D8 geniyle yapılan immunizasyon çalışmalarında bu genin RNA interferens (RNAi) etkisiyle kenelerin beslenme ve yumurtlamalarında önemli azalmalara yol açtığı saptanmıştır. RNAi, kenelerde ve çoğu ökaryotlarda bulunan ve koruyucu özeliği olan post-transkripsiyonel bir gen-silencing mekanizmasıdır (276).

2.11.2. Preimmunizasyon

Enzootik alanlarda yetiştirilen sığırlar, babesiosis'e karşı ilk altı ayda enfeksiyon immunitesi veya preimmunisyon kazanırlar. Düşük miktarda parazitemiye sahip olan bu hayvanlar o bölgedeki lokal homolog suşlara karşı belirli ölçüde bağışıktırlar. Parazitin bulunmadığı instabil bölgelerden söz konusu stabil bölgelere getirilecek hayvanlara suni preimmunizasyon kazandırma uygulamaları yapılabilmektedir. Bu amaçla, homolog suşlara karşı premunisyon amacıyla duyarlı hayvanlara, babesiosis'li sığırın enfekte kanı verilip klinik belirtilerin oluşması ile birlikte küratif dozun altında imidocarb preparatları uygulanarak hastalığın ortaya çıkışı önlenebilmektedir. Sonuç olarak, belirli bir miktar parazitin canlı kalmasına müsaade edilmekte ve homolog suşlara karşı duyarlı sığırların preimmun duruma getirilmesi sağlanmaktadır (185).

2.11.3. Aşılama

Babesiosis'e karşı korunmada kene kontrolü büyük önem taşımasına rağmen, akarisidlerin pahalı oluşu, bazı akarisidlere karşı direnç şekillenmesi, uygulama sırasında hayvan hareketleri ile ilgili düzenlemelerin ve karantinanın tam olarak yapılamaması ve birçok işletmede akarisidlerin banyo veya püskürtme şeklinde uygulanacağı sistemlerin genellikle yetersiz olmasından dolayı bu tip endemik hastalıklara karşı korunmada en yaygın kullanılan ve en ucuz şekilde başarı sağlayan korunma metodu aşı uygulamasıdır. Babesiosis'e karşı hazırlanan aşılar; attenüe canlı aşılar, inaktif aşılar, subunit aşılar, rekombinant aşılar ve DNA aşıları olmak üzere beş grup altında incelenebilmektedir (273).

Güney Afrika, İsrail ve Avustralya'da *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın attenüe suşlarından hazırlanan canlı aşılar rutin olarak ve deneysel amaçlarla kullanılmaktadır (43). Canlı aşılar, humoral ve hücresel bağışıklık sistemlerini uzun süre uyararak daha kalıcı bir bağışıklık sağlayabilmektedirler. Sığır babesiosis'inde canlı aşının sağladığı koruyucu bağışıklık, genellikle 3-4 hafta içinde gelişmekte ve dört yıl kadar devam edebilmektedir (43, 277, 278). Canlı aşılarda kullanılan suş, patojen suşun seri pasajlar neticesinde elde edilen apatojen bir mutantıdır ve pasajlardan dolayı bağışıklık oluşturma özelliği kaybolmamaktadır. Ancak farklı coğrafyalarda bulunan suşların patojeniteleri ve antijenik yapıları arasında önemli farklılıklar bulunabilmektedir. Dolayısıyla bir coğrafyada koruyucu etkinliği olan bir canlı aşının başka bir ülkedeki hayvanlar için koruyucu etkiye sahip olmama ihtimali söz konusudur. Başka bir coğrafik suştan hazırlanan canlı aşının, bir başka coğrafyada kullanılması, farklı bir suşun o ülkeye girmesi anlamına da gelmektedir (186). Bu nedenle babesiosis'e karşı korunma amacıyla hazırlanacak bir aşı suşu, aşı uygulamasının yapılacağı coğrafik suşlardan hazırlanmalıdır. Attenüe suş, *in vitro* veya *in vivo* olarak üretilip, standardize edilmekte ve etkinlik/güvenlik kontrolleri yapıldıktan sonra aşı olarak kullanılmaya hazır hale getirilmektedir (43). Attenüe canlı aşılar, kullanımdan sonra bazı hayvanlarda klinik enfeksiyonların şekillenmesine sebep olabilmektedir. Canlı aşıların bu tip dezavantajları içermesi sebebiyle rekombinant aşı çalışmalarına hız verilmiştir (197, 185). Bu amaçla özellikle Avustralya, Arjantin, Güney Afrika, İsrail ve Uruguay'da rekombinant aşı çalışmaları devam etmektedir (43). 1990'dan beri Avustralya'da *B. bovis*'in 3 suşu ve *B. bigemina*'nın bir suşu (G suşu) aşı üretiminde kullanılmaktadır

(279). Özellikle canlı aşı olarak Güney Afrika, İsrail ve Avustralya'da *frozen* (dondurulmuş) aşılar kullanılmakta ve bu aşılar *chilled* (soğutulmuş) aşılara göre daha fazla dayanıklılık göstermektedir. Bu aşıların soğukta muhafaza edilmesi amacıyla gliserol kullanılmaktadır. Nakil esnasında sıvı N_2 (nitrojen) veya kurubuz (CO_2) kullanılması gerekmektedir. Avustralya'da üretilen monovalent *B. bovis* ve *B. bigemina* aşıları (Combovac) ticari olarak 2001'den beri satılmaktadır (43). Bunun yanında soğutulmuş formda aşılar, sadece Avustralya'da 1966-2003 yılları arasında 35 milyon doz uygulanmıştır. Bu aşının dondurulmuş formlara göre avantajları: kısıtlı kaynaklarla daha kolay üretilmesi, naklinin ve kullanımının daha kolay olmasıdır. Halen Avustralya'da kullanılan bu aşılar 2 ml doz içerisinde $1x10^7$ *B. bovis*, $25x10^6$ *B. bigemina* ve $1x10^7$ *Anaplasma centrale* içermektedir. Bu aşıların raf ömrü oldukça kısa olup yaklaşık 4 gündür (280). Bunun yanında rekombinant aşı çalışmaları genellikle, doğal immun sığırlarda fonksiyonel olarak immunodominant olan merozoit yüzey antijenleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu amaçla genellikle *B. bovis* msa-2c antijenleri ile *B. bovis* ve *B. bigemina*'da ortak olarak bulunan rap1 geni kullanılmaktadır. msa-1 ve msa-2c antijenlerinin merozoitlerin eritrositlere invazyonunu nötralize ettiği fakat bu antijenlerin sığırlarda koruma sağlamadığı bildirilmiştir (244, 281). rap-1 antijeninin ise sadece homolog suşlara karşı kısmi bir koruma sağladığı saptanmıştır (282). Bunun yanında ilk olarak *Plasmodium* türlerinin meydana getirdiği hastalığa karşı geliştirilen ve daha sonra tüm apikompleksan parazit türleri için güvenli bir aşı adayı antijeni olarak belirlenen Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) üzerinde yapılan çalışmalar son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Rekombinant aşıların geliştirilmesinde hedef proteinler arasında en umut verici protein olarak saptanan AMA-1 antijeni, sığır babesiosis'ine yol açan diğer türlerden *B. bovis* ve *B. divergens*'te de çalışılmıştır. Günümüzde dünyada *B. bigemina*'nın AMA-1 proteini üzerine yapılmış herhangi bir protein analiz ve immunolojik ekspresyon çalışması bulunmamaktadır (192-194). Bu çalışmaların yanında alternatif olarak DNA aşı adjuvantları geliştirilmeye başlanılmıştır. *Babesia bovis*'in B hücrelerinden elde edilen DNA içerisindeki CpG motifleri, IgG üretimini teşvik etmektedir. Aktive olmuş makrofajlar da IL-12, TNF-α ve NO salgılayarak parazitlerin replikasyonun kontrolü için önemli bir doğal immunite sağlamaktadır (200).

2.12. *BABESIA* TÜRLERİNİN ANTİJENİK YAPILARI VE APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 (AMA-1)

2.12.1. Eritrositlere Giriş Mekanizması ve Antijenleri

Yaşam sikluslarını devam ettirebilmek ve humoral immun yanıt komponentlerinin etkisinden kurtulmak amacıyla apikompleksan parazitler mutlaka hücre içerisine invaze olmak zorundadırlar. Bu nedenle günümüzde yapılan aşı çalışmaları bu noktada merozoitlerin eritrositlere tutunmasını engellemeye yönelik aşı adayı belirleme araştırmalarıyla devam etmektedir.

Apikompleksan parazitler, hücreye invazyon esnasında çeşitli molekülleri (ligandları) kullanırlar. *Babesia* sporozitlerinin eritrositlere girişi endositozisle ve bir parazitofor vakuol oluşturmadan gerçekleşmektedir (283, 284). Bunun için öncelikle sporozoitin temas ettiği eritrositin yüzeyinde, önce aktin ve myozinin rol aldığı mekanizma ile bir invaginasyon meydana gelir. Bunu takiben sporozoitler, direkt olarak konak eritrositine girerler. Bu şekilde eritrosit içerisine giren sporozoitler, trofozoit şekline dönüşürler. Olgunlaşan trofozoit, merogoniye benzer şekilde ikiye bölünerek çoğalır. Meydana gelen merozoitler de aynı şekilde sağlam eritrositlere penetre olur ve bu şekilde eritrositleri enfekte ederler (37, 39). Diğer taraftan merozoitlerin yüzeyinde bulunan komplement 3 (C3) proteininin eritrositlerde bulunan C3 reseptörü ile bağlanması da penetrasyonda önemli rol oynar (38). *Babesia* merozoitleri ile konak eritrositleri arasındaki moleküler mekanizma ise tam olarak bilinmemektedir. *Plasmodium*'da olduğu gibi, ekstraselüler *Babesia* merozoitleri de penetre olacağı eritrositlere tutunmak için hücre yüzeyindeki çeşitli reseptörleri ararlar. *Babesia* merozoitleri, hedef eritrositlere tutunmak için öncelikle yüzeylerinde bulunan surface-coating molekülleri kullanırlar ve etkili bir şekilde hedefe odaklanırlar (39). *Babesia bovis* merozoitleri yüzey kısımlarında VMSA (variable merozoit surface antigen) ailesinde yer alan 5 antijen (msa-1, msa-$2a_1$, msa-$2a_2$, msa-2b, msa-2c) ihtiva ederler (40). Bu antijenler; amino-terminal hidrofobik bir sinyal bölgesi, hidrofilik merkez bölge ve glikozil-fosfotidilinositol (GPI) içeren karboksi-terminal bir uç taşırlar. İnvazyonda kullanılan diğer ligandlar ise merozoitlerin roptri ve mikronem proteinleridir (40). Bu proteinler, bilinen tüm hücreler tarafından ortama salınan, 30-100 nm arasında değişen boyutlara sahip endozomların olgunlaşmaları sırasında endozom zarının içe doğru kıvrılmasıyla meydana gelen ve nano kesecikler olarak adlandırılan eksosomlar ile

taşınabilmektedirler (285-287). Apikompleksan protozoon parazitlerde rhoptry-limiting membranın içe doğru kıvrılmasıyla oluşan çok kesecikli yapılar (MVB, multivesicular bodies), N-terminali dışta C-terminali ise lümende yer alan roptri proteinlerinden ROP2'yi içinde barındıran eksosomları üretirler. Üretilen eksosomların, bu proteinlerle oluşan ilişkilerinden dolayı apikompleksan protozoon parazitin konak hücreye invazyonu aşamasında önemli bir yapı olarak görev aldığı düşünülmektedir (286, 287). Nitekim, Hakansson et al. (288) *T. gondii* üzerinde yaptıkları çalışmada, invazyonda önemli rol oynayan roptri proteini ROP1'in bu kesecikler içinde bulunduğunu saptamışlardır. Ayrıca eksosomların, sadece invazyonda değil, aynı zamanda hücreler arası haberleşmede sinyal iletimi, genetik materyal aktarımı ve immun yanıt düzenlenmesi gibi birçok biyolojik işleyişte de kilit roller üstlendiği gösterilmiştir (289-292).

Babesia türlerinin konak hücreye tutunmaları esnasında, apikal organellerinden merozoit yüzeyine ve/veya konak eritrositleri (ve/veya retikulositleri, canine babesiosis'inde olduğu gibi) içerisine bazı proteinleri salgılarlar. Bu organeller, parazitin anterioründe üst kısımda bulunur ve roptri, mikronem ve dense granüllerini kapsar. Özellikle roptri ve mikronemlerden salınan proteinlerin, hücreye invazyonda önemli rol oynadığı düşünülür (41). *Babesia bovis*'te 60 kDa ağırlığında bir roptri proteini (rap-1) bulunur. Rap-1 proteini, konak hücrenin uyarılmasından sorumlu birkaç immunojenik epitopu bulundurur (293, 294). Mikronem ürünü olarak da, Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) (295) ve thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) (296) molekülleri eritrositlere invazyonda kullanılır. İnvazyonda kullanılan bir diğer molekül ise küresel cisim (spherical body, 225 kDa) komponentleridir. Özellikle *Babesia* türlerinde apikal kompleks elemanları içerisinde küresel cisim komponentleri bulunur. Bugüne kadar spherical body komponenti olarak üç protein tespit edilmiştir (sbp-1, sbp-2, sbp3). Bu proteinler, N-terminal bölgede olduğu farz edilen sinyal peptidlerini içerirler. Parazit, bu peptidleri konak eritrositlerinin içerisine salar (281, 297, 298). Apikompleksan parazitlerde, klass XIV filogenetik sınıfında miyozinle ilgili hücresel fonksiyonları yürüten miyozin genleri bulunur. Myozin, apikompleksan parazitlerin eritrositlere invazyonunda rol oynamaktadır (299-301).

İnvazyonda parazite ait reseptörlerin yanı sıra konak eritrositlerine ait reseptörler de rol oynamaktadır. Sialic asit reziduelerinin parazitler için reseptör görevi yaptığı tespit

edilmiştir. Sialik asit rezidueleri N-asetilnöraminik asit (Neu5Ac), N-glikolilnöraminik asit (Neu5Gc) komponentlerini içerir (302). Bu molekül, sağlıklı insanlarda kolayca tespit edilemezken diğer memelilerde sıklıkla bulunur. Konak eritrositlerindeki diğer molekül ise tripsin veya α-kemotripsin-sensitif proteinlerdir (302). Yapılan çalışmalarda tripsinin *Babesia* türlerinin eritrositlere invazyonunu önemli ölçüde azalttığı ve sadece *B. bigemina*'nın invazyonunu engellediği, *B. divergens*'in ise tripsin ve α-kemotripsin'den etkilenmediği tespit edilmiştir. *Babesia bovis* de bu her iki molekülden etkilenmiş ve invazyonu azalmıştır (303, 304). Bir diğer molekül heparin, merozoitlerin yüzeyine bağlanarak parazitin konak eritrositi içerisine girmesini inhibe eder (305). Heparin, heparan sülfat (HS)'ın sülfatlanmış formu olup kan koagulasyon sisteminin inhibitörü, mast hücreleri ve bazofillerin biosentetik komponentleridir. HS ise daha fazla hücre tipi tarafından üretilen bir alarmindir (184). Dolayısıyla HS proteoglikanları, parazitlerin konak hücre tarafından tanınmasında kullanılır. Sonuç olarak *Babesia* merozoitleri hem kendi komponentleri ve hem de konak eritrositlerine ait komponentler vasıtasıyla eritrositlere invaze olmaktadırlar (306, 307). *Babesia* merozoitlerinin invaze oldukları eritrositlerde canlılıklarını sürdürebilmeleri ve gelişebilmeleri, konak hücresinin sitozolünde ve plazma membranında oluşturdukları modifikasyonlara bağlıdır (308). *Babesia bovis* ile enfekte sığır eritrositlerinin glikoza karşı geçirgenliği, enfekte olmayanlara göre daha çok artar (309, 310). *Babesia* türleri, temel enerji kaynağı olarak konağın heksozlarını kullandıklarından, enfeksiyon sırasında, konağın da glikolizinde artış olur (283, 311). *Babesia bovis* ile enfekte eritrositlerde, enfekte olmayanlara göre glikoz ve oksijen tüketiminin 2,5 kat, piruvat üretiminin ise 7 kat arttığı ve ATP sentezinde de önemli bir artış olduğu saptanmıştır (312).

Heksozların enfekte hücre içine girişinin doyurulamayan kanal/por benzeri mekanizmayla (non-saturable channel/pore-like mechanism) veya doyurulabilir Na^+-bağımsız heksoz taşıyıcıları aracılığı ile gerçekleştiği öne sürülmüş ise de bu olay, hala tam olarak açıklanamamıştır. *B. bovis* genomunda BboHT1 ve BboHT2 olmak üzere iki heksoz taşıyıcısı bulunur. Glikozun yanı sıra fruktozu da taşıyan BboHT1'in D-glikoza göre D-fruktoza affinitesi düşüktür. BboHT1 üzerinde yürütülen radiotracer çalışmalar, BboHT1'in doyurulabilir, Na^+-bağımsız stero-spesifik bir heksoz taşıyıcısı olduğunu ortaya koymuştur. *Babesia bovis* suşları arasında BboHT1 ve BboHT2'nin nükleotid sekansı yönünden farklılık bulunduğu; BboHT2'de daha fazla olan bu farklılıkların

fonksiyonel olarak önemli rezidülerde olmadığı saptanmıştır. BboHT1 ve BboHT2'nin orthologları, *B. bigemina*'nın genom sekansında da bulunurlar. Ancak, bu parazitlerin eritrositlerin sitoplazmasında serbestçe çoğalmaları ve konağın besin maddelerine doğrudan ulaşabilmeleri, genomlarında değişikliklere neden olarak bazı metabolik yolların (örneğin yağ asidi biyosentezi) kaybolmasına yol açabilmektedir (313).

2.12.2. Antijenik Varyasyonlar

Babesia türlerinin gen dizilimlerindeki veya gen kümelerindeki değişikliklerden kaynaklanan antijenik varyasyon, aynı zamanda konak immunitesinden kurtulma mekanizması olarak çalışmaktadır. Antijenik varyasyon heterolog suşlara duyarlılıkta önemli rol oynar (190, 314, 315). *Babesia* spp.'de bulunan antijen genlerinin birçoğu multigen ailesinde bulunur ve bu genler, antijenik varyasyonlarda rol oynarlar. Avustralya'dan elde edilen *B. bovis* suşunda *babR* geni tespit edilmiş (316), daha sonra Meksika'da elde edilen izolatta bu genin bir homoloğu olan msa-1 ve msa-2 genleri (317) saptanmıştır. Bu her iki izolatı kodlayan genler, akraba olmakla beraber izolatlar arasında çapraz reaksiyon tespit edilememiş ve genler üzerinde bulunan epitopların izolatlara özgü olduğu belirlenmiştir (318). babR, msa-1 ve msa-2 genleri bariz bir şekilde homologken, bu genler üzerindeki aktif kromozomal rekombinasyonlar yüzünden DNA mutasyonlu çeşitli alleller oluşmaktadır. Buna bağlı olarak da mRNA, gen boyunca farklı okuma bölgelerine transfer edilmekte ve farklı polipeptid ürünler meydana gelmektedir (317). Bunun yanında bazı allelik genler, kalıtsal olabilmekte ve parazit antijenlerindeki hızlı değişimlerle alakaları bulunmamaktadır. *Babesia* spp., *T. parva* ve *P. falciparum*'da bulunan rap-1 genleri, N-terminal ve C-terminal sekans bölgelerinde çeşitli allelik genler taşımalarına rağmen, bu genlerin hızlı antijenik varyasyonlarda rol oynadığına dair bir kanıt henüz bulunamamıştır (319-322). *Babesia bovis* VESA (variable erythrocyte surface antigen) genlerindeki antijenik varyasyon, en az 300 polimorfik kopyaya sahip büyük bir gen ailesindeki gen konversiyonuna bağlı olarak proteinlerdeki amino asit farklılıklarından kaynaklanır (190). Buna karşın rap-1 genindeki antijenik farklılık, daha az sayıdaki amino asit farklılığından ileri gelmektedir (323).

Mevcut çoğu anti-babesial aşılar, özellikle parazit yüzeyinden eksprese olmuş antijenlerin yüksek oranda varyasyonları sebebiyle yeterli immunolojik etkinliği gösterememektedirler. Bu nedenle *Babesia* türlerinin eritrosit invazyonu aşamasında

kullandığı tanımlanmış ya da henüz tanımlanamamış şüpheli birçok molekül, aşı geliştirilmesi ve üretilmesinde hedef olarak halen araştırılmaktadır (192-194).

2.12.3. Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1)

Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1), mikronem ürünü bir transmembran proteindir. Tüm apikompleksan parazit türlerinde tip I integral membran protein olarak bulunan AMA-1, N-terminal (NT) cysteine-rich ektodomain, tek transmembran domain ve bir C-terminal (CT) içeren sitoplazmik uç (Cyt) olmak üzere toplam üç yapıdan meydana gelmektedir (192, 324, 325).

2.12.3.1. Apikompleksan İnvazyon ve AMA-1

Apikompleksan parazitik protozoonlar; coccidiosis (*Eimeria* spp.), cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* spp.), toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*), Malaria (*Plasmodium* spp.), theileriosis (*Theileria* spp.) ve babesiosis (*Babesia* spp.) gibi insan ve hayvanlarda yüksek oranda morbitide ve mortaliteyle seyreden ve ekonomik yönden önemli hastalıklara yol açarlar. Bu protozoon parazitler, konak hücreye invazyonda ve hücreye penetre olmuş parazitin çevresinde meydana gelen vakuol (PV) oluşturmada apikal kompleks elemanlarının salgıladığı özel moleküllere ihtiyaç duyarlar. Çoğu apikompleksan parazit, konak immun savunma etkisinden kurtulmak için hızlı bir invazyon prosesini takip eder. Bu aktif invazyon üzerine yapılan araştırmalarda son zamanlarda özellikle korunmuş bir membran proteini olan Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) üzerine odaklanılmıştır. Söz konusu parazitlerin konak hücreye invazyonlarında ana moleküllerden biri olan AMA-1 ile olan ilişkileri üzerinde durulmaktadır. AMA-1, ilk olarak 1982 yılında *Plasmodium knowlesi*'de tanımlanmıştır (326). Apikal salgı organeli olarak bilinen mikronemlerden orijin alan AMA-1, tip 1 transmembran bir proteindir. Ayrıca son yapılan çalışmalarda AMA-1'in invaze olan parazitlerin yüzeylerinde yer aldığı da bildirilmiştir (327). Bu nedenle AMA-1, son yıllarda özellikle insan Malaria'sı için üretilen aşı adaylarında, parazitin eritrositlere invazyonunu engelleyebilmek ve çeşitli formlarına (AMA-1 peptidleri, rekombinant formlar, DNA'sı kodlanmış formlar) karşı immunizasyon gerçekleştirilerek kanda bulunan parazitlere karşı koruma sağlayabilmek için hedef protein olarak seçilmiş ve çalışılmıştır (325, 326, 328).

AMA-1; *Toxoplasma, Plasmodium* ve *Babesia* türleri için esansiyel bir proteindir (193, 329, 330). Transgenik parazitlerin ekspresyonu AMA-1'in formları tarafından mutasyona uğratılmaktadır (331-335). AMA-1'in konak hücreye invazyonda rol oynadığı net bir şekilde bilinse de buradaki mekanizmanın nasıl işlediği noktasında bazı hususların iyi anlaşılması gereklidir. Şöyle ki: AMA-1'in apikal reoryantasyondaki rolü, eritrositlere tutunmadaki işlevi, roptiri sekresyonları ve hareket mekanizmasındaki etkileri ile intraselüler replikasyon mekanizmalarındaki rollerinin bilinmesiyle tam olarak anlaşılabileceği belirtilmiştir (331, 333). Bu kapsamda AMA-1, daha çok *Toxoplasma* ve *Plasmodium* türlerinde araştırılmıştır (325, 336). Ancak son zamanlarda, AMA-1'in protein yapısı ile invazyondaki etkinliği, *Babesia divergens*, *B. bovis* ile *B. orientalis* üzerinde de çalışılmaya başlanmıştır (192, 337-340).

2.12.3.2. AMA-1'in Ectodomain Yapısı

AMA-1'in koruyucu bir antijen olduğunun keşfiyle birlikte, ekstraselüler yapısının karakterizasyonu, özellikle gelecekte bu antijen üzerine yapılacak çalışmalar için önemli bir konu haline gelmiştir. *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* ve *T. gondii*'den izole edilen AMA-1'in kristalleşmiş ekstraselüler yapı formlarının, intramoleküler disülfid bağlarının analizleri sonucunda başlıca üç ana domainden oluştuğu bildirilmiştir (341). Domain III, küçük homolog yapılardan oluşurken, domain I ve II, PAN modülleri (plasminogen, nematode, apple) benzeri yapılardan oluşmaktadır. PAN modülleri, protein-protein veya protein-karbonhidrat etkileşimleri ile bir takım adhezyon proteinleri arasındaki ilişkide kolaylaştırıcı bir rol oynamaktadırlar. AMA-1 ectodomainin dikkat çekici bir özelliği de polimorfik düğümlerle sarılı, korunmuş, hidrofobik bir oluk içeren subdomain I yapısı içermesidir. Bu yapısal özellik, *P. falciparum* AMA-1'in (PfAMA-1) eritrositlere invazyonunda kritik bir rol oynamaktadır. Özellikle, bu yapıda bulunan iki invazyon-inhibitör monoklonal antikor, bağlanma aşamasında, PfAMA-1 ile *Plasmodium* rhoptry neck proteinleri arasındaki etkileşmeyi bloklayarak konak hücre invazyonunda önem arz eden multiprotein kompleks oluşumunu engellemektedir (342, 343).

2.12.3.3. AMA-1'in Hareketli Bağlanma (Moving Junction)'daki Rolü

Gelişmiş, fonksiyonel bir yapıya sahip olan *T. gondii* AMA-1 (TgAMA-1) ve TgAMA-1 ile ilişkili proteinler, bu parazit türünün konak hücreye invazyonunda ve hareketli bağlanmasında [moving junction (MJ)] önemli rol oynamaktadırlar. Bu konuda yapılan

çeşitli immunopresipitasyon çalışmalarla birlikte, TgRON2, TgRON4, TgRON5 ve TgRON8 gibi TgAMA-1 ile ilişkili, hareketli bağlanmada önemli rol oynayan, kompleks rhoptry neck proteinleri de identifiye edilmiş ve invazyondaki önemleri bildirilmiştir (344-347). Bir *T. gondii* rhoptry neck proteini olan TgRON4 homoloğu protein, *Neospora* türü parazitler için de yine MJ'nin önemli proteinlerindendir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucu *B. divergens* AMA-1 (BdAMA-1), *B. bovis* AMA-1 (BbAMA-1) ile *B. orientalis* AMA-1 (BoAMA-1)'lerin invazyonda rhoptry neck proteinler (RON) ile etkileşim halinde bulundukları ve MJ sırasında invazyonda birlikte görev aldıkları ortaya konmuştur (192, 337-340).

Plasmodium türlerinde MJ, parazitteki yüzük benzeri yapıların parazit ve konak plazma membranlarına tutunmasıyla oluşan bir bağlantı tipidir. Bu MJ'da RON ve AMA-1 proteinleri arasındaki etkileşim de önemlidir. *Toxoplasma gondii* üzerinde yürütülen çalışmalarda bu bağlanmanın, TgRON2'nin C terminal bölgesi ile N terminal bölgesi konak hücre sitoplazmasında bulunan TgAMA-1'in ectodomaini arasında meydana geldiği bildirilmiştir (348, 349). İnkubasyon periyodunda olan parazitlerde TgRON2'nin C terminal bölgesinin rekombinant formunun bağlanma şiddetini azalttığı görülmüştür. Bunun sonucunda, bağlanmada C terminal bölgesinin, bağlanma şiddetini parazitin fizyolojik periyoduna göre artırıp-azaltabilme yetisine sahip olduğu anlaşılmıştır. Benzer bağlanma karakteristikleri ve invazyon etkisinin azaldığı durumlar, PfRPN2'nin ortholog bölgelerinde de gözlemlenmektedir. Meydana gelen bu etkileşimler, AMA-1 ve RON2 arasındaki ilişkinin invazyonda ne kadar etkin olduğunu ve bu iki proteinin tüm apikompleksan parazitlerde hayati bir öneme sahip olduklarını göstermektedir (348).

AMA-1 ve RON2 arasındaki etkileşimler, konak hücreye invazyonda büyük öneme sahip olduğundan konağın savunma sistemi de genellikle bu etkileşimi hedef alarak onu bozmaya yönelik bir reaksiyon olarak ortaya çıkmaktadır. Bu kapsamda R1 peptid ve AMA-1 spesifik antikorlar devreye girmekte ve invazyonu engellemektedirler. Ancak parazit, buna cevaben invazyonunda sadece AMA-1 ve RON2 arasındaki etkileşimi kullanmayıp aynı zamanda korunmuş intermoleküler yapılarını ve AMA-1'in epizomal ekspresyonlarını da devreye sokarak konağın bu savunma sistemine karşı alternatif yollar üretebilmektedir (348).

Toxoplasma gondii'nin vahşi suşları (wild-type strains) üzerinde yapılan bir çalışmada, TgAMA-1'in invazyon sırasında parazit yüzeyinin üzerinde dağılmış bir halde bulunduğu gözlemlenmiştir (329, 350, 351). Buna karşılık *P. falciparum* merozoitleri ile yapılan başka bir çalışmada ise PfAMA-1'in MJ sırasında merozoitlerin canlılığını aniden kaybetmelerine bağlı olarak immunfloresan incelemede görülememişler ve dolayısıyla lokalizasyonları da tespit edilememiştir (352).

AMA-1'in MJ oluşumundaki kesin rolü, henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak, konak hücre ve parazit membranındaki yakın apozisyonunun AMA-1 fonksiyonuna bağlı olarak şekillendiği açık bir şekilde ortaya konmuştur. Örneğin, *T. gondii* üzerinde yapılan bir çalışmada, AMA-1 ekspresyonunun gerçekleşmediği ve bunun sonucu olarak parazitin konak hücreye yakınlaşmadığı ve hareketli bağlanmanın da oluşmadığı gösterilmiştir (331). Bu nedenle TgAMA-1, hareketli bağlama yapısının oluşması için zorunlu bir proteindir. İnvazyon öncesinde, salgılanmış RON2 proteinlerine bağlanma olasılığı dolayısıyla bir miktar TgAMA-1 parazit yüzeyine dağılmış bir şekilde bulunmaktadır. Bu RON2 ile TgAMA-1 arasındaki bağlanma sonrasında konak hücre yüzeyine bir yol oluşturulmakta ve RON2'ye bağlı AMA-1 molekülleri, parazitin apikal ucunu çevreleyen bir halkanın meydana gelmesini sağlamaktadırlar. Apeks yüzeyinin hemen altında, apikal polar halka adı verilen, apikompleksan parazitlere özgü bir mikrotubular organizasyon merkezi olan bu yapı, başlangıç halka formasyonu ve polar halka ile ilgili protein identifikasyonunun oluşmasını sağlamaktadır. Böylece invazyon için esas olan AMA-1 ve diğer proteinler arasındaki geçici bir bağın kurulması garanti altına alınmış olmaktadır (353, 354).

İdentifiye edilmiş hareketli bağlanma kompleksinin bir üyesi olan AMA-1, bu kompleksi parazit kenarına sabitleyebilen en iyi proteindir. AMA-1 ve RON2 arasındaki etkileşim, hareketli bağlanma kompleksinde ve sonrasında meydana gelen invazyon için esastır (349). AMA-1 içinde bu etkileşimi sağlayan başka bir molekülün olduğu tahmin edilse de günümüzde bununla ilgili herhangi bir veri henüz ortaya konamamıştır (345, 346).

2.12.3.4. AMA-1'in Apikal Reoryantasyondaki Rolü

Henüz *Babesia* türlerinde AMA-1'in apikal reoryantasyondaki rolünü açıklayan ileri düzeyde çalışmalar bulunmamakla beraber AMA-1'in *Toxoplasma gondii* ve

Plasmodium türlerinde detaylı bazı araştırmalar yapılmıştır. Örneğin, *Plasmodium knowlesi*'de AMA-1 (PkAMA-1)'in invazyon inhibitörü epitopları ile meydana gelen antikorların, *P. knowlesi* merozitlerine karşı etkisinin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi sonucu, apikal reoryantasyonsuz parazitlerin eritrositler ve MJ oluşumları ile alelade, gevşek bir bağlantı oluşturmaya çalıştıkları belirlenmiştir (355). Bu çalışmalar, AMA-1'in merozoitlerin apikal reoryantasyonu için zorunlu bir protein olduğunu göstermiştir. *Plasmodium falciparum* merozoitlerinin invazyon-inhibitör R1 peptidi ile etkileşiminin mikroskobik canlı video kayıtlarının alındığı bir çalışmada ise söz konusu savunma etkileşimi sonucu parazitin eritrositlere girişinin engellendiği ve merozotilerin kendilerine tekrar yön verdiği (reorient) görülmüştür (333, 343). *Plasmodium* merozoitleri, invazyondan önce kolayca reorient olabiliyorlarken bir başka apikompleksan parazit olan *Toxoplasma* merozoitleri için bu durum geçerli olamamaktadır. Bu nedenle reorient olan *Plasmodium* merozoitleri, direkt olarak parazit-konak moleküler bağlantılarını kolayca yapabilmekte veya eritrosit yüzeyinde herhangi bir engele veya kısıtlamaya maruz kalmadan bağlanabilmektedirler. Ancak *Toxoplasma* merozoitleri için bu bağlanma bu denli kolay olmamaktadır (356).

2.12.3.5. AMA-1'in Roptri Sekresyonundaki Rolü

Roptri sekresyonu, invazyon prosesini başlatmak için salınmak zorundadır. Böylece, ortaya çıkan rhoptry bulb proteinleri, konak hücre çevresi ile parazitin apikal ucu arasındaki bölgede yer alarak invazyonda etkin rol oynarlar (357, 358). Günümüzde RON'ların MJ'de identifikasyonlarının yapılmasıyla birlikte, rhoptry neck kompartımanında meydana gelen sekresyonun, invazyonun ilk adımında kullanılmasının zorunlu olduğu ve bu nedenle olayın başlangıcında salınması gerektiği ortaya çıkmıştır. *Toxoplasma gondii* üzerinde yapılan bir araştırmada, TgAMA-1'in TgRON'ların sekresyonuna hiçbir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (344). Öte yandan, Cytochalasin D'nin tedavi amaçlı kullanıldığı başka bir olguda ise, rhoptry bulb sekresyonunun TgAMA-1 salınımından sonra arttığı gözlenmiştir (331). Ayrıca aynı çalışmada Cytochalasin D'nin, aktin flamentlerin dağıtılmasında önemli bir rol oynadığı ve bu nedenle konak hücre invazyonunun önlendiği de rapor edilmiştir. Bu durum, aynı zamanda veziküler benzeri yapıların başka bir ifadeyle evakuollerin oluşumuna da yol açmıştır (288, 331). Aynı yöntemi uygulayan Mital et al. (331) TgAMA-1 salınımından sonra ROP-ilgili evakuollerin miktarlarında azalmalar olduğunu saptamıştır. Son

yapılan araştırmalarda ise roptri sekresyonu için AMA-1 ve RON'lar arasındaki etkileşimin zorunlu olmadığı bildirilmiştir (336, 359). Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda roptri sekresyonunun büyük olasılıkla tek seferde gerçekleştiği ve bunun da konak hücreye girmeden hemen önce meydana geldiği belirtilmektedir. Hareketli bağlanmada başarısız olma ve dolayısıyla konak hücreye invaze olamama durumlarında ise roptri sekresyonunun en yüksek seviyeye çıktığı ve konak hücre sitozolüne direkt olarak girdiği gözlenmiştir. Tüm bu araştırmaların sonuçları doğrultusunda günümüzde hala AMA-1'in hangi bölgesinin ne ölçüde roptri sekresyonunda rol aldığı bulunamamıştır (349, 360).

2.12.3.6. AMA-1'in Sitoplazmik Kuyruk Yapısı

AMA-1'in ektodomain yapısı, özellikleri ve fonksiyonları hakkında çalışmalar olmakla birlikte, sitoplazmik kuyruk yapısı hakkında yapılan araştırmalar sınırlıdır (361). Çeşitli apikompleksan parazitlerin AMA-1 sitoplazmik yapılarının nükleotid dizilerinin çoklu hizalamaları sonucu bu bölgenin genelde korunmuş bir yapıda olmadığı görülmüştür. Ancak sadece üç bölge, diğerlerine kıyasla daha korunmuş olarak ön plana çıkmıştır. Bunlar: bir tryptophan (PfAMA-1-W603, TgAMA-1-W520), bir threonine (PfAMA-1-T613, TgAMA-1-T533) ve bir serine (PfAMA-1-S610) amino asitlerinin kodladığı bölgelerdir. Tüm bu yapılar, sitoplazmik yapının C terminal bölümünde yer almaktadırlar. Bu nedenle C terminal bölgesi, sinyal molekülleri ile birlikte invazyonda önemli bir yapı olarak görev almaktadır (362).

2.12.3.7. AMA-1'in İnvazyon Sürecindeki Rolü

Hareketli bağlanmanın temelini oluşturan molekülü belirlemek ve invazyon sürecinde hangi molekülün daha etkin bir rol oynadığını saptamak, tüm bu süreci anlayabilmek için oldukça önemlidir. Aldolase enzimi ve actin/myosin motorları ile etkileşimli AMA-1'in güçlü bir invazyon için kilit bir role sahip olduğu belirtilmektedir. AMA-1 ektodomain etkileşimleri ile RON kompleksi ve sitoplazmik domainlerin moleküler motora bağlanmalarıyla birlikte parazitin ileri doğru hareket etmesi sağlanmaktadır. Böylece hareketli bağlanma için bir temel oluşturulmaktadır. Bunun yanında, TRAP/MIC2 proteinleri de invazyon için esansiyel olan parazitin kayma hareketlerinde rol oynamaktadırlar (363, 364). AMA-1 ve RON proteinleri, hareketli bağlanmanın bu aşamasında TRAP/MIC2 proteinlerine göre daha pasif bir rol oynamakla beraber daha

çok parazit ve konak membran arasında sıkı ve güçlü bir bağ kurulmasında etkin olmaktadırlar.

AMA-1'in söz konusu süreçteki rolünün araştırıldığı çalışmalarda, hareketli bağlanma sırasında fonksiyonunun bloklanması sonucu parazitin konak hücre içine girme hareketinin engellenebildiği ancak TRAP/MIC2 proteinleri ve myosin/actin motorlarının aktiviteleri sonucu konak hücre membranının paraziti kuşatmasının engellenemediği belirlenmiştir (333, 335).

2.12.3.8. AMA-1'de Polimorfizm

AMA-1'in polimorfizmi daha çok *Plasmodium* türlerinde araştırılmıştır. 1990 yılından bu yana yapılan araştırmalar sonucunda PfAMA-1'de polimorfizm olduğu ortaya konmuştur (365). Polimorfizmin oluşmasında özellikle konak immun yanıtının etkin bir rol oynadığı belirtilmiştir. Chesne-Seck et al. (366) yaptıkları bir çalışmada, PfAMA-1 sekans kaydı oluşturulan *in vitro* ve vahşi suşları çoklu hizalama yapılarak incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda, PfAMA-1'de 64 polimorfik pozisyonun bulunduğunu ve bu polimorfizmlerin; 9'unun pro-sekansta, 32'sinin domain I'de, 11'inin domain II'de, 9'unun domain III'de ve 3'ünün sitozolik bölgede görüldüğünü bildirmişlerdir. Papua Yeni Gine'de yürütülmüş diğer bir çalışmada ise, semptomatik ve asemptomatik vakalardan elde edilen örneklerin AMA-1 sekanslarında farklılıklar olduğu saptanmıştır (349). Yine *P. vivax*'ın AMA-1 gen bölgesi üzerinde yapılan bir çalışmada söz konusu bölgenin polimorfik bölgeler içerdiği bildirilmiştir (362). Böylece *Plasmodium* odaklı yapılan bu çalışmalarla AMA-1'de polimorfizm olabileceği ispatlanmıştır.

2.12.3.9. AMA-1'e Karşı Oluşan Doğal İmmun Yanıtlar

Doğal enfekte hayvanlarda AMA-1 antikorları daha çok IgG_1 ve IgG_3 ve nadir olarak da IgG_2 ve IgG_4 tiplerinde ortaya çıkmaktadır. Bu antikorlar, çoğunlukla domain I ve domain II'ye etki etmekte olup domain III' e karşı oluşan cevapları ise genellikle düşük seviyelerdedir (367, 368). Sıtma vakası görülen insanlarda yapılan araştırmalarda, AMA-1 antikor seviyesinin, merozoit surface protein 1'in C-terminal komponenti ($MSP1_{19}$), glutamate-rich protein (GLURP) ve merozoit surface protein 3 (MSP3)' e karşı şekillenen antikor seviyelerinden daha yüksek miktarda bulunduğu bildirilmiştir

(349, 350). Öte yandan AMA-1 T hücre yanıtlarının, meydana gelen parazitemiyle ilgili olduğu da yine bu araştırmalar kapsamında ortaya konmuştur (353).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın materyalini, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı cryobankında (sıvı nitrojen, -196 °C) muhafaza edilen 288.07 kodlu ve 15.09.2007 tarihli, deney danasında *in vivo* olarak kültüre edilmiş (*in vivo*: 1. pasaj), enfekte edilen danadan ilk enfeksiyonu takiben 8. gün alınmış, %4,1 *B. bigemina* parazitemisine sahip suş ile aynı suşun *in vitro* olarak kültüre edilmiş (*in vitro*: 1. pasaj) ve %11 oranında parazitemiye sahip pasajı oluşturmuştur. AMA-1 gen bölgesini kodlayan nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi, belirlenen nükleotid dizilimlerinin intron içerip içermediğinin tespiti ve elde edilen sekansların ekspresyon analizleri öncesinde açık okuma çerçevesi (ORF) veri tabanında değerlendirilmesi amacıyla ilk olarak *B. bigemina* Kayseri/Türkiye olarak isimlendirilen bu iki suştan genomik DNA (gDNA) izolasyonu yapılmıştır.

3.1. GENOMİK DNA İZOLASYONU

Genomik DNA izolasyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Parazitoloji Laboratuarı'nın ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır. Cryobankta muhafaza edilen ve mikrosantrifüj tüplerine bölünmüş kan pasajlarından birer örnek DNA ekstraksiyon işlemlerine başlamadan önce oda ısısında çözünmeye bırakılmıştır. Kalan diğer örnekler ise RNA ekstraksiyon işlemleri için seri bir şekilde, çözünmeden sıvı nitrojen tankına geri konulmuştur. Çözünen pasajlardan DNA izolasyonu, Axygen Firmasına ait AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit'inin prosedürüne göre yapılmıştır.

Kullanılan ticari kitin içeriği Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan ticari kitin içeriği

Kitin İçeriği	**AP-MN-BL-GDNA-250 örnek için**
Miniprep kolon	250 adet
2 ml Microfuge tube	250 adet
1,5 ml Microfuge tube	250 adet
Buffer AP1	150 ml
Buffer AP2	30 ml
Buffer W1A concentrate	120 ml
Buffer W2A concentrate	2x72 ml
Buffer TE	60 ml

Ekstraksiyon işlemine başlamadan önce ticari kitin prosedürüne göre Buffer W1A ve Buffer W2A solüsyonları üzerine saf (%100'lük) ethanol eklenmiştir. Kit, kullanılana kadar oda ısısında muhafaza edilmiştir. Ticari kitin önerileri doğrultusunda gDNA izolasyonu aşağıdaki protokole göre yapılmıştır:

1. İşleme başlamadan önce, kan örnekleri vorteksle homojenize edildi. Örneklerin karışmaması amacıyla ependorf tüplerinin üzerine protokol numaraları yazıldı. Kit içerisinde bulunan Buffer TE, önceden ısısı 65 ^{o}C'ye ayarlanmış su banyosu içerisine konuldu.

2. 1,5 ml'lik ependorflara 500 µl Buffer AP1 eklendi.

3. 200 µl kan, pipetle alınarak protokol numaralarına göre ependorflara ilave edildi. Tüplerin ağızları kapatılarak 10 saniye vortekslendi.

4. İyice vortekslenen örneklerin üzerine 100 µl Buffer AP2 ilave edilerek ependorf tüpleri tekrar vortekslendi.

5. Örnekler oda ısısında 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücresel kısımların dibe çökmesi sağlandı.

6. Her bir örnek için 2 ml'lik ependorf tüplerine miniprep kolon yerleştirildi. Santrifüj işlemi sonucu üstte kalan süpernatant pipet yardımıyla alınarak miniprep kolonlar içerisine konularak 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

7. Santrifügasyon sonucu, süpernatant içerisinde parazite ait gDNA varsa, bunlar DNA'yı tutma özelliğinde olan miniprep kolon'da kaldı ve geri kalan süpernatant da 2 ml'lik ependorfların dip kısımlarına süzüldü. Dibe çöken süpernatantlar döküldü ve miniprep kolonlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirildi. Miniprep kolonlar içerisine ilk yıkama solüsyonu olan 700 µl Buffer W1A ilave edilerek oda ısısında 2 dakika bekletildi. Sonra 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

8. Miniprep kolondan süzülerek ependorfun dibine çöken sıvı uzaklaştırıldı. Miniprep kolonlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirildi. İçerisine ikinci yıkama solüsyonu olan Buffer W2A'dan 800 µl ilave edildi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

9. Süzülen sıvı tekrar uzaklaştırılarak miniprep kolonlar bu tüplere geri yerleştirildi. Bu basamakta ikinci yıkama solüsyonu Buffer W2A'dan 500 µl eklenip 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek tekrar yıkama işlemi yapıldı. Bu son yıkama opsiyonel olarak yapılan bir işlem olup sekanslama işlemlerinde problem teşkil edebilecek tuz ve enzimlerin tamamen elimine edilmesi amacıyla yapılmıştır.

10. Yıkama işlemi sonucu dibe süzülen sıvı kısım uzaklaştırılarak miniprep kolonlar boş ependorflar içerisine yerleştirildi. Herhangi bir solüsyon eklenmeden boş tüpler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama solüsyonları içerisindeki ethanolün tamamen uçması sağlandı.

Miniprep kolonlar 1,5 ml'lik yeni ependorf tüplerine yerleştirildi. Üzerlerine, önceden 65 ^{o}C'lik su banyosuna konulmuş olan Buffer TE'den 50 µl ilave edilerek oda ısısında 1 dakika bekletildi. Daha sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak genomik DNA elde edildi. Elde edilen DNA'lar analize tabi tutulana kadar derin dondurucuda (-20 ^{o}C) muhafaza edildi.

3.2. APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 (AMA-1)'İ KODLAYAN GEN BÖLGESİNİN AMPLİFİKASYONU

DNA ekstraksiyonu sonrasında elde edilen her iki suşa ait gDNA izolatları, *B. bigemina* Apical Membrane Antigen-1'i (BbigAMA-1) kodlayan gen bölgesinin amplifikasyonu amacıyla PCR işlemine tabii tutulmuştur. PCR'a hazırlık aşamasında kullanılan

malzemeler herhangi bir kontaminasyonun önüne geçmek amacıyla ultraviyole (UV) sterilizasyon özelliği olan steril kabinde hazırlanmıştır. PCR reaksiyonunda, BbigAMA-1 gen bölgesinin amplifikasyonu için Torina et al. (193)'ın diyazn ettikleri primer çiftleri kullanılmıştır. Bbig-AMA1Fb ve Bbig-AMA1Rb adlı primerlerin nükleotid dizilimleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. AMA-1 gen bölgesinin amplifikasyonu için PCR'da kullanılan primerler

Primer Adı	**Primer Dizilimi (5'---3')**	**TM* (^{0}C)**
Bbig-AMA1Fb	GCAGTGCATATTGAATAGGATTAC	60,1
Bbig-AMA1Rb	TCAGTTGAGCTTAGTCAGGTGTACTG	66,3

*TM: Erime sıcaklığı

Macrogen (The Netherlands) firmasına sentezlettirilen primerler, firmanın önerileri doğrultusunda her birinin konsantrasyonu 100 pmol/µl olacak şekilde steril deiyonize su ile sulandırılmıştır. Sulandırılan primerler, 1,5 ml'lik bir ependorf tüpüne stok primer solüsyonundan 100 µl miktarında alınarak porsiyonlanmıştır.

PCR reaksiyon karışımı, 50 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 25 µl ticari Master Mix (Maxima Hot Start PCR Master Mix, Thermo Scientific, USA), 100 nM her bir primer ve 50 ng/µl template DNA olarak hazırlanmıştır. Steril kabin içerisinde hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 0,2 ml'lik DNA'se ve RNA'se free ependorf tüpleri içerisine konulmuştur. Tüpler thermal cycler cihazına (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, California, USA) yerleştirilerek amplifikasyona tabi tutulmuştur. Amplifikasyon için protokol; ön denatürasyon: 95 °C'de 4 dk; 35 siklus, denatürasyon: 95 °C'de 1 dk, bağlanma: 55,1 °C'de 30 s, uzama: 72 °C'de 90 sn; final uzama: 72 °C'de 15 dk olacak şekilde dizayn edilmiştir. PCR testinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla negatif kontrol olarak sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

3.3. PCR ÜRÜNLERİNİN ELEKTROFOREZ İLE GÖRÜNTÜLENMESİ

Babesia bigemina Kayseri/Türkiye suşları gDNA'larının, BbigAMA-1 gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonların görüntülenmesi amacıyla yatay elektroforez tankı (CLP) kullanılmıştır. Toplam hacim 1 lt olacak şekilde; 980 ml deiyonize su üzerine 20 ml 50XTAE (Tris-acetate-EDTA) buffer eklenerek elde edilen

solüsyon, hem jel hazırlanmasında hem de elektroforez tankının içerisinin doldurulmasında kullanılmıştır. Ürünlerin görüntülenmesinde %1,5'luk agaroz jel hazırlanmıştır. Jelin fazla kalın olmaması için 500 ml'lik bir beher içerisinde toplam hacim 50 ml olacak şekilde; 0,75 mg agaroz tartılarak üzerine 50 ml 1XTAE ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım; agaroz, sıvı içerisinde tamamen eriyene kadar ısıtılmıştır. Karışımın buharlaşmasını engellemek amacıyla beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Karışım hazır hale geldiğinde biraz soğumaya bırakıldıktan sonra üzerine 3 µl ethidium bromide ilave edilmiş ve ethidium bromidin sıvı içerisine tamamen dağılması için yavaş bir şekilde bilek hareketleriyle solüsyon karıştırılmıştır. Tamamen hazır hale gelen solüsyon jel tablasına dökülmüş ve incelenecek örnek sayısına göre taraklar yerleştirilmiştir. Jel tamamen soğuduğunda jel tablası ile birlikte elektroforez tankına yerleştirilmiş ve 1XTAE solüsyonu ile dolu tankın içerisinde taraklar yavaşça çıkarılmıştır. Elden edilen PCR ürünlerinin her birinden 10 µl alınıp jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. İlk gözlere bantların boylarının ölçülmesinde kullanılan DNA ladder (Thermo Scientific, USA), son kuyucuklara ise negatif örnek yüklenmiştir. Yüklenen örnekler; sabit akımda, 110 V'da 50 dakika süreyle yürütülmüştür. Süre sonunda örnekler, CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile UV ışın altında görüntülenip analiz edilmiştir.

3.4. HEDEF GEN BÖLGESİ AMPLİKONLARININ JELDEN İZOLASYONU

Elektroforez görüntüleme sonucunda hedef baz aralığında görünen bantlar, ilgili genin klonlanması öncesinde direkt PCR ürünü kullanılması ile meydana gelebilecek komplikasyonları önlemek amacıyla High Pure PCR Product Purification Kitinin (Roche) önerileri doğrultusunda jelden ekstrakte edilmiştir. Jelden ekstraksiyon işleminin uygulandığı ticari kitin içeriği Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3. High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) İçeriği

Kitin İçeriği	**Miktarı (50 örneklik)**
Binding buffer [3 M guanidine-thiocyanate, 10 mM Tris-HCl, %5 ethanol (v/v), pH 6,6 (25 ^{o}C)]	30 ml
Washing buffer [20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, ph 7,5 (25 ^{o}C)]	50 ml
Elution buffer [10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (25 ^{o}C)]	40 ml
High pure filter tubes	50 adet
Collection tubes	50 adet

Jelden ekstraksiyon işlemi ticari kitin önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

1. Hedef büyüklükteki bant, jelden steril bir bisturi ucu yardımıyla kesilerek daha önce hassas terazide darası alınan 1,5 ml'lik DNA'se RNA'se free bir tüp içerisine yerleştirildi.

2. Daha sonra içinde kesilen jel parçası bulunan tüp tekrar tartıldı ve böylelikle jelin ağırlığı hesaplanmış oldu.

3. Jel parçasının ağırlığına göre 100 mg ağırlığındaki jel parçası için 300 µl binding buffer olacak şekilde solüsyon jel parçasının üzerine eklendi.

4. Ependorf tüpü 30 saniye vortekslendi.

5. Önceden 56 ^{o}C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde tüp 10 dakika inkubasyona bırakıldı. Her 2 dakikada bir ependorf tüpü vortekslendi.

6. Tüp içerisindeki agaroz jel parçası tamamen çözündükten sonra 100 mg ağırlığındaki jel parçası için 150 µl isopropanol olacak şekilde solüsyon ilave edilerek tüp iyice vortekslendi.

7. Ticari kitin içeriğinde bulunan toplama tüpleri içerisine high pure filter tüpleri yerleştirildi. Ependorf tüpünün içerisindeki bütün sıvı pipet yardımıyla tamamen bu filtreli tüpün içerisine boşaltıldı.

8. Sıvıyı içeren tüp oda ısısında 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

9. Alttaki toplama tüpüne süzülen sıvı boşaltıldı ve üstteki filtreli tüp tekrar aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.

10. Özel filtresi sayesinde DNA'yı içine hapseden filtreli tüpün içerisine DNA'yı yıkama amacıyla 500 µl Wash buffer ilave edilerek 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

11. Santrifügasyondan sonra alta süzülen sıvı uzaklaştırıldı ve filtreli tüp aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.

12. İkinci yıkama amacıyla üzerine tekrar 200 µl Wash buffer ilave edilerek 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. İkinci yıkama ile sekanslamada muhtemelen problem teşkil edebilecek tuz ve enzim gibi maddeler uzaklaştırılmış oldu.

13. Alta süzülen sıvı tekrar uzaklaştırıldı. Filtreli tüp bu kez, yeni 1,5 ml'lik DNA'se RNA'se free bir tüp içerisine yerleştirildi.

14. Filtrede hapsolan DNA'yı alttaki ependorfa süzmek amacıyla 50 µl Elution buffer ilave edildi. 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek 1,5 ml'lik steril tüp içerisine süzülen sıvı DNA'yı ihtiva eden jel pürifiye PCR ürünü olarak, klonlanma aşamasına kadar -20 ^{o}C'de muhafaza edildi.

3.5. BBIGAMA-1 GENİNİN KLONLANMASI

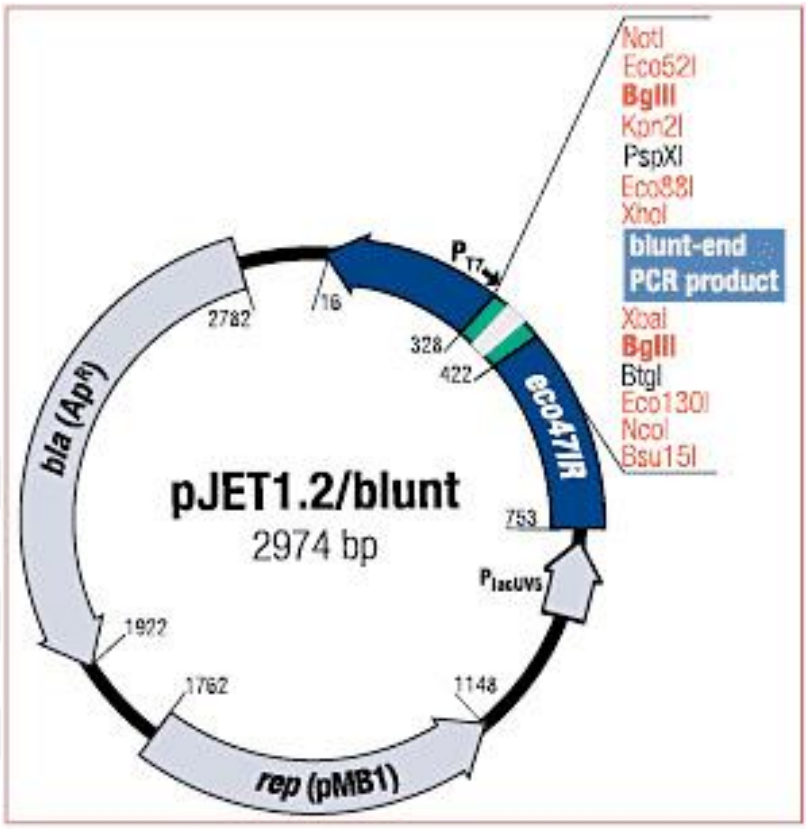
3.5.1. BbigAMA-1 Geninin pJET1/2 Plazmidine Ligasyonu

Jel pürifikasyonu yapılmış PCR ürünlerinin klonlanmasında CloneJET PCR Clonning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Klonlama reaksiyonu üreticinin önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanmış ve yapılmıştır:

2X Reaksiyon buffer	10 µl
PCR ürünü Jel Pürifiye Örnek	2 µl
DNA Blunting enzim	1 µl
Steril Deiyonize Su	5 µl
Toplam	18 µl

Hazırlanan karışım vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70 ^{o}C'de su banyosunda 5 dk inkübe edilmiş ve sonrasında hemen buz üstüne alınmıştır.

Karışıma daha sonra 1 µl pJET1.2/blunt CloningVector (50 ng/ µl) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklenerek son hacmi 20 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım 22°C'de 30 dk bekletildikten sonra 5 µl'si transformasyon için kullanılmıştır. pJET1.2/blunt CloningVector haritası Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. pJET1.2/blunt CloningVector

3.5.2. Rekombinant Plazmidin Kompetan Hücrelerine Transformasyonu

Transformasyon için 5 µl'lik ligasyon ürünü buz üzerinde tutulan 100 µl OneShot TOP 10 chemically compotent *Escherichia coli* hücrelerine (Invitrogen, ABD) eklenmiş ve buz üzerinde 30 dk inkübe edilmiştir. 30 dk sonunda karışım, 42 ^{o}C'de 1 dk tutulmuş ve hemen ardından buz üzerinde 3 dk bekletilmiştir. Böylece rekombinant plazmidin transformasyonu sağlanmıştır. Daha sonra karışıma oda ısısında bekletilen 250 µl S.O.C. medium (%2 Tryptone, %0,5 maya ekstraktı, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM glikoz) eklenmiştir. 37^{o}C'de çalkalayıcılı inkubatörde 1,5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı daha sonra LB (lysogeny broth) katı besiyerine ekilerek bir gece yine 37 ^{o}C'de inkübe edilmiştir.

LB katı besiyerinde koloni gelişimi gözlendikten sonra besiyerindeki koloniler numaralandırılarak yeni bir besiyerine tekrar ekilmiştir. Besiyeri, 37 ^{o}C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Rekombinant plazmidin kompetan hücrelerine transformasyonu aşamalarındaki çalışmalar

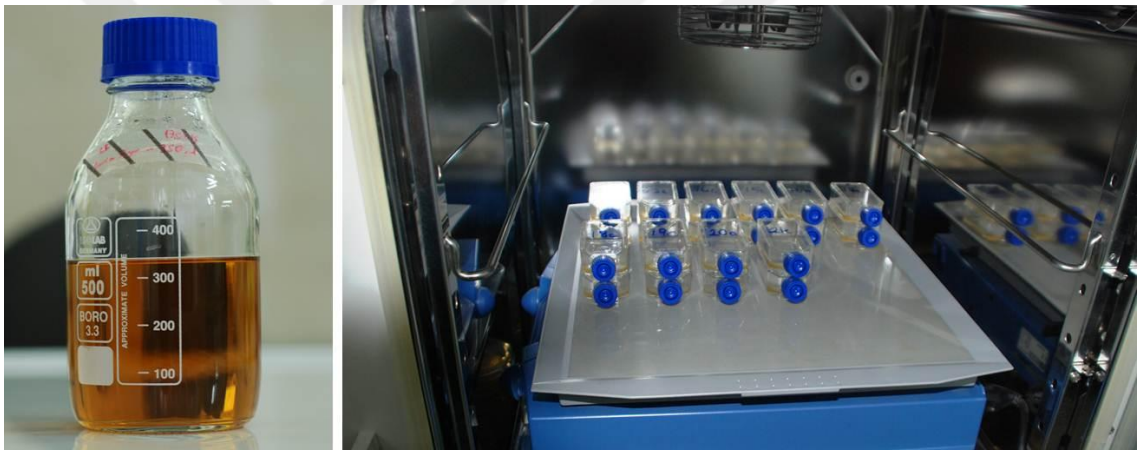
3.5.3. Klonlanmanın PCR Tarama ile Doğrulanması

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plazmidi içerip içermediğini tespit etmek için koloni PCR taraması yapılmıştır. Koloni PCR için 10 µl I Taq master mix'i (Bio-Rad Hercules, CA, ABD), 0,4 µl pJET1.2 Forward (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') ve pJET1.2 Reverse (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') primerleri ile karışımlar hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlara katı besiyerinde üreyen kolonilerden steril pipet ucu ile alınan örnekler bulaştırılmıştır. Karışımlar steril deiyonize su ile toplam 20 µl'ye tamamlanmıştır. Thermal cyclerda protokol; ön denatürasyon: 95 ^{o}C'de 3 dk; 25 siklus, denatürasyon: 94 ^{o}C'de 30 s, bağlanma: 60 ^{o}C'de 30 s, uzama: 72 ^{o}C'de 1 dk; final uzama: 72 ^{o}C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR sonucu elde edilen amplikonlar %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve

Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile UV ışın altında görüntülenip analiz edilmiştir.

3.5.4. PCR Tarama ile Transformasyonu Doğrulanmış Kolonilerin Sıvı Besi Yerinde Çoğaltımı

Pozitif bulunan kolonilerden plazmid DNA'sı elde etmek için LB katı besiyerinden steril özeler ile alınan koloniler steril flasklar içinde 100 µl/ml ampisilin içeren 5 ml'lik LB sıvı besi yerlerine ekimi yapılarak 37^{o}C'de 110 rpm'de çalkalayıcıda bir gece inkübe edilmiştir (Şekil 3.3). Üreme gözlenen sıvı besi yerlerinden alınan örnekler 2 ml'lik ependorflar içerisine alınarak 6000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım dökülüp pelletler daha sonra kullanılmak üzere -20 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3. LB sıvı besi yeri ve çalkalayıcı üzerinde ekimi yapılan 5 ml'lik LB sıvı besi yeri içeren flasklar

3.5.5. Rekombinant Plazmidlerin Saflaştırılması

Peletten plazmid izolasyonu için AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Axygen, ABD) prosedürü takip edilmiştir. Axygen plazmid pürifikasyon ticari kitinin önerileri doğrultusunda plazmid ekstraksiyon işlemi aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

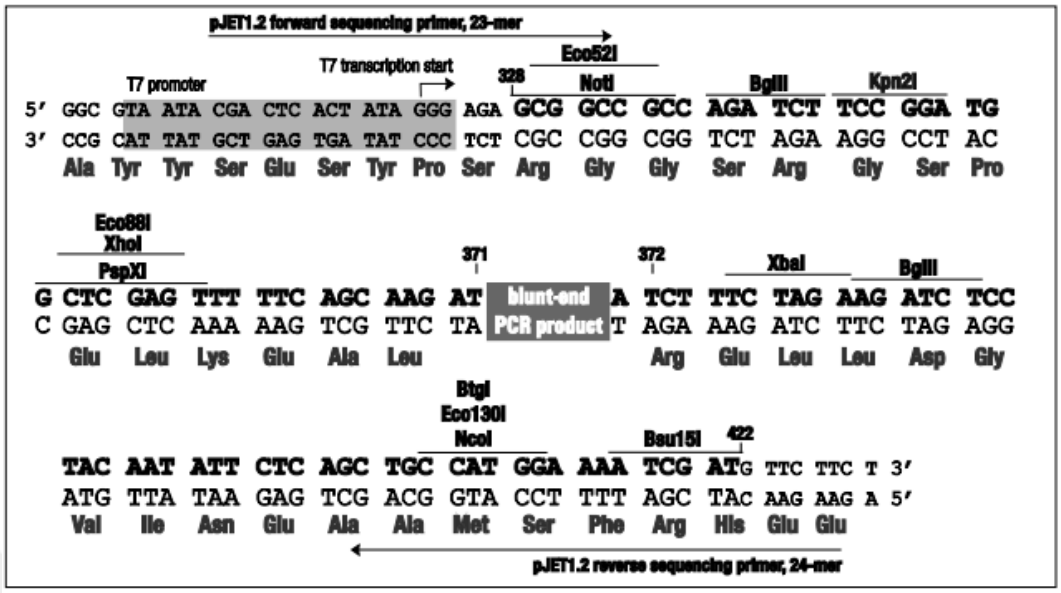
1. -20 ^{o}C'de saklanan pelletin oda sıcaklığında çözünmesi sağlandıktan sonra üzerine 250 µl Buffer S1eklenmiş ve vortekslendi.
2. Üzerine 250 µl Buffer S2 eklenmiş ve el ile 6 kez hafifçe çalkalandı.
3. Daha sonra üzerine 350 µl Buffer S3 eklendi ve yine el yardımı ile hafifçe 8 kez çalkalandı.
4. Karışım daha sonra 12,000×g'de 10 dakika santrifüj edildi.

5. Santrifüj sonrası supernatant alınıp AxyPrep Plasmid Miniprep kolon içine konulup 12,000×g'de 1 dk santrifüj yapıldı.
6. Alttaki toplama tüpüne süzülen sıvı boşaltıldı ve üstteki Miniprep kolon tekrar aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
7. Yıkama amacıyla her bir Miniprep kolon üzerine 500 µl Buffer W1 ilave edilerek 12.000 ×g'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Santrifügasyondan sonra alta süzülen sıvı uzaklaştırıldı ve Miniprep kolon aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
9. Tüp üzerine 700 µl Buffer W2 eklenerek 12.000 ×g'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu basamak 2 kez tekrar edildi.
10. Toplama tüpüne süzülen sıvı tekrar uzaklaştırıldı. Miniprep kolon bu kez, yeni 2 ml'lik DNA'se RNA'se free bir tüp içerisine yerleştirildi ve membrana bağlanan Buffer W2'yi uzaklaştırmak için 12.000×g'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonrası Miniprep kolon temiz bir 1,5 ml'lik tüp içerisine yerleştirildi ve plazmid DNA'sı elde etmek amacıyla üzerine 50 µl Eluent eklendi ve oda ısında 1 dk beklendikten sonra 12.000 ×g'de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Santrifüj işlemi sonrası 1,5 ml'lik steril tüp içerisine süzülen sıvı plazmid DNA'sı -20 ^{o}C'de muhafaza edildi.

3.5.6. Restriksiyon Enzim ve PCR Analizleri

Miniprep kit ile saflaştırılan rekombinant plazmidler, restriksiyon enzimleri ile kesilerek ve vektör spesifik primerler ile PCR analizleri yapılarak klonlanan genin varlığı yönünden araştırılmıştır. Enzim kesimi için *Ava I* ve *Xba I* (Thermo Scientific, ABD) enzimleri kullanılmıştır (Şekil 3.4). Elde edilen plazmid DNA'sını restriksiyon enzimleri ile kesmek için aşağıdaki oranlarda master mix hazırlanmıştır:

Su	14 µl
10X FastDigest® buffer	2 µl
DNA	4 µl
FastDigest® enzyme	1 µl
Toplam	20 µl



Şekil 3.4. *Aval* ve *Xbal* enzimlerinin bağlanma noktaları

Karışım vortekslenmiş ve 37 ^{o}C'de 5 dk su banyosunda inkübe edildikten sonra termal inaktivasyon için 65 ^{o}C'de 5 dk su banyosunda tekrar inkübe edilmiştir. Takiben, örnekler %1,5'luk agoroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile UV ışın altında görüntülenip klonlanan genin varlığı yönünden analiz edilmiştir. Bunun yanında ikinci bir doğrulama analizi yapılmıştır. Bu amaçla plazmid DNA'ların amplifikasyonu pJET1.2 Forward ve pJET1.2 Reverse primerlerinin kullanıldığı PCR analizleri ile yapılmış ve takiben elde edilen amplikonlar %1,5 'luk agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile UV ışın altında görüntülenmiştir.

3.6. KLONLANAN BBIGAMA-1 GENİNİN SEKANS, FİLOGENETİK, SNPS VE AÇIK OKUMA ÇERÇEVESİ (ORF) ANALİZLERİ

Klonlama sonucu elde edilmiş ve doğrulanmış rekombinant plazmidler, sekans analizleri için Macrogen (The Netherlands) firmasına gönderilmiştir. Her bir örnek 20 µl hacimde, primerler ise her bir örnek için en az 10 µl hacimde olacak şekilde firmaya iletilmiştir. Primerlerin konsantrasyonları 5 µM olacak şekilde ayarlanmıştır. Örneklerin sekans dizileri pJET1.2 forward ve reverse primerleri ile çift yönlü olarak yapılmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar Quality (Phred) skorlarına göre analiz edildikten sonra Geneious R8 (369) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin contigleri yapılarak, vektör DNA'sı ile kıyaslanmış, insert olmuş

hedef gen bölgesi belirlemiş ve izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların BLASTN (370) analizleri yapıldıktan sonra Mega 6.0.6 (371) ve Geneious R8 (369) genetik analiz yazılımlarıyla GenBank'a kayıtlı diğer BbigAMA-1 izolatları ile çoklu ve ikili hizalamaları yapılarak filogenileri araştırılmış, intron içerip içermediği kontrol edilmiş ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur. Takiben, mevcut nükleotid dizilerinin GenBank kayıtları yapılmış ve erişim numaraları alınmıştır.

Filogenetik analizlerde, elde edilen izolatların nükleotid ve amino asit dizilimleri ile, GenBank'a kaydedilen, BbigAMA-1 gen bölgesinin tamamını içeren izolatların nükleotid ve amino asit dizilimleri kullanılmıştır. Filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde Maximum Likelihood (ML) ve Bayesian analizleri (BA) uygulanmıştır. ML analizleri Mega 6.0.6 (371) yazılımı üzerinden gerçekleştirilmiştir. ML analizlerinde sekans evrimi için en uygun modelin belirlenmesinde jModelTest 0.0.1 (372) kullanılmış ve en düşük Akaike Bilgi Kriteri (AIC) değerine sahip olan model filogenetik ağaç oluşturulmasında kullanılmış, node güvenilirliğinin belirlenmesinde bootstrap replikasyon değeri 1000 alınmıştır. BA analizlerinde uygun model belirlenmesinde yine jModelTest 0.0.1 (372) kullanılmış ve en düşük Bayesian Bilgi Kriteri (BIC) değerine sahip olan model filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılmıştır. Bayesian analizleri Geneious R8 (369) yazılımı üzerinden MrBayes plugin (373) kullanılarak gerçekleştirilmiş, Markov Chain Monte Carlo taramaları 1.100,000 jenerasyon için 4 zincirle ve ağaç örneklemesi her 200 jenerasyonda bir (ilk 100,000 ağaç "burn in" olarak) çıkarılmıştır.

Erişim numarası alınan ve GenBank tarafından tescil edilen izolatların protein dizilimleri; başlangıç ve bitiş sinyal kodonlarını (1 amino asit kodlayan 3'lü diziler) belirlemek, BbigAMA-1 fraksiyonlarını göstermek amacıyla açık okuma çerçevesi (open reading frame, ORF) analizlerini tabii tutulmuş ve söz konusu analizler için web tabanlı ORF Finder (374) yazılımı kullanılmıştır.

BbigAMA-1 proteinlerinin nükleotid ve amino asit dizilimlerinin belirlenmesiyle birlikte çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak *in silico* analizler de yapılmıştır. BbigAMA-1 transmembran bölgelerindeki amino asit dizilimlerinin sinyal peptid analizleri ve dizilimlerdeki tahmini antijenik peptidlerin varlığı Geneious R8 (369) yazılımı üzerinden EMBOSS Protein Analysis 1.0 plugin yazılımı kullanılarak yapılmıştır. BbigAMA-1 proteinlerinin transmembran sarmallarının analizleri ise yine

Geneious R8 (369) yazılımı üzerinden Transmembrane Prediction Tool 0.9 plugin yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzoelektrik nokta ve proteinlerin tahmini moleküler ağırlıkları ExPASy (375-377) programı ile hesaplanmıştır. Nükleotid ve amino asit dizilimlerindeki polimorfik alanlar ve haplotipler ProSeq3 (378) yazılımı kullanılarak belirlenmiştir.

DNA dizi analiz sonuçlarına göre BbigAMA-1 proteinlerinin üç boyutlu yapıları Phyre2 Protein Homology/Analogy Recognition Engine V2.0 programı (379) ile elde edilmiş ve görüntülenmesi Jmol: An open-source Java viewer (380) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.7. BBIGAMA-1 PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONU

3.7.1. RNA İzolasyonu

RNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Parazitoloji Laboratuarı'nın ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır. Cryobankta muhafaza edilen ve mikrosantrifüj tüplerine bölünmüş kan pasajlarından RNA ekstraksiyon işlemleri için ayrılan örnekler önce oda ısısında çözünmeye bırakılmıştır. Çözünen pasajlardan RNA ekstraksiyonu, GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, USA) kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan ticari kitin içeriği Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4. RNA Ekstraksiyonunda kullanılan ticari kitin içeriği

Kitin İçeriği	**50 Örnek için (#K0731)**
Proteinase K	600 µl
Lysis Buffer	40 ml
Wash Buffer 1 (concentrated)	40 ml
Wash Buffer 2 (concentrated)	23 ml
Water, nuclease-free	30 ml
GeneJET RNA Purification Kolons pre-assembled with Collection Tubes	50
Collection Tubes (2 ml)	50
Collection Tubes (1,5 ml)	50

Ekstraksiyon işlemine başlamadan önce ticari kitin prosedürüne göre Wash Buffer 1 ve Wash Buffer 2 solüsyonları üzerine %100'lük ethanol eklenmiştir. Proteinase K -20 °C'de muhafaza altına alındıktan sonra kit, kullanılana kadar oda ısısında muhafaza edilmiştir. Tüm santrifüj işlemleri +4 °C'de yapılmıştır. Ticari kitin önerileri doğrultusunda RNA ekstraksiyon işlemi şu şekilde yapılmıştır:

1. İşleme başlamadan önce, 0,5 ml'lik ependorfa alınan kan örnekleri vorteksle homojenize edildi. Örneklerin karışmaması amacıyla ependorf tüplerinin üzerine protokol numaraları yazıldı. Bu sırada, soğutmalı santrifüj (Sigma 3K15, Almanya) +4°C'ye ayarlanarak santrifüj içi sıcaklığın düşmesi beklenildi.

2. 1200 µl hacimdeki Lysis buffer'a 24 µl 14,3 M β-mercaptoethanol eklendi.

3. 0,5 ml'lik ependorfta bulunan kan örnekleri soğutmalı santrifüjde 600 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

4. Santrifüj sonrası dibe çöken pelletlere dikkat edilerek supernatant atıldı.

5. Pelletler üzerine 600 µl Lysis buffer eklendi ve tüpler kapakları kapatılarak vortekslendi.

6. Vortekslenen örneklerin üzerine 450 µl ethanol eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.

7. Karışımdan 700 µl alındı ve kit içinde mevcut olan toplama tüplerinin üzerinde bulunan GeneJET RNA purifikasyon kolonlarına aktarıldı.

8. Sıvıyı içeren tüpler 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

9. Alttaki toplama tüplerine süzülen sıvı boşaltıldı ve üstteki kolonlar tekrar aynı toplama tüpleri içerisine yerleştirildi.

10. Tüpler tekrar 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

11. Alttaki toplama tüpleri atıldı ve kolonlar 2 ml'lik yeni toplama tüplerine yerleştirildi.

12. Kolonlar üzerine 700 µl Wash buffer 1 ilave edilerek 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

13. Santrifüjden sonra alta süzülen sıvı uzaklaştırıldı ve kolonlar aynı toplama tüpleri içerisine yerleştirildi.

14. İkinci yıkama amacıyla üzerine 600 µl Wash buffer 2 ilave edilerek 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

15. Santrifüjden sonra alta süzülen sıvı uzaklaştırıldı ve kolonlar aynı toplama tüpleri içerisine yerleştirildi.

16. Üçüncü yıkama amacıyla üzerine 250 µl Wash buffer 2 ilave edilerek 15.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

17. Alta süzülen sıvı tekrar uzaklaştırıldı. Kolonlar bu kez, yeni 1,5 ml'lik kit içeriğinde mevcut olan tüpler içerisine yerleştirildi.

18. Kolonlar üzerine 50 µl kit içeriğinde mevcut olan nükleaz free su eklendi ve 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

19. Santrifüj sonrası pürifikasyon kolonları çıkarıldı ve hazır durumda olan RNA'lar cDNA sentezi için -20 ^{o}C'de muhafaza edildi.

3.7.2. Tamamlayıcı DNA (cDNA)'nın Sentezi

Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi, Maxima H Minus First Strand cDNA Syntesis Kit with dsDNase (Thermo Scientific) ile yapılmıştır. Çalışmalar buz üstünde yürütülmüştür.

3.7.2.1. Genomik DNA Eleminasyonu

Genomik DNA eleminasyonu öncesinde -20 °C'de muhafaza edilen total RNA'lar oda ısısında çözünmeye bırakılmıştır. Çözünen örnekler ile beraber karışım buz üstünde aşağıda verildiği gibi hazırlanmıştır:

10X dsDNase Buffer	1 µl
dsDNase	1 µl
Total RNA	3 µl
Su	5 µl
Toplam	10 µl

Hazırlanan karışım vortekslenip santrifüj edilmiştir. Daha sonra su banyosunda 37 °C'de 2 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tekrar vortekslenip santrüfüj edilen karışım buz üzerine alınmış ve RT-PCR işlemine geçilmiştir.

3.7.2.2. RT-PCR

Genomik DNA eleminasyonu sonrası karışımın bulunduğu tüpe aşağıda verilen ve kit içeriğinde mevcut olan malzemeler eklenmiş ve toplam hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır:

Primer (oligo $(dT)_{18}$ primer	1 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
5X RT Buffer	4 µl
Maxima H Minus Enzyme Mix	1 µl
Su	3 µl
Toplam	10+10=20 µl

Hazırlanan karışım vortekslenip santrifüj edilmiştir. Daha sonra thermal cycler'da 50 °C'de 30 dk ve reaksiyonu sonlandırmak için 85 °C'de inkübe edilmiştir. Kullanıma hazır olan cDNA'lar PCR işlemi yapılıncaya kadar -70 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.7.3. PCR

Ekspresyon öncesinde her iki suş için BbigAMA-1 geninin plazmid vektörüne klonlanması amacıyla PCR işlemi yapılmıştır. PCR analizinde kullanılacak primerler Champion™ pET Directional TOPO Expression Kit'de (Invitrogen, ABD) önerilen şekilde diyazn edilmiştir. Bu amaçla, web tabanlı açık okuma çerçevesi ORF Finder (374) programı kullanılarak analizler yapılmış ve bu analizler sonucunda ticari kitin önerileri de takip edilerek, forward primerin 5' kısmına "*CACC*" nükleotid dizisi eklenmiştir. Primerlerin tasarlanmasında web tabanlı Primer-Blast (381) programı kullanılmış ve dizayn edilen primerler Geneious R8 (369) ile kontrol edilmiştir. Primer dizilimleri Tablo 3.5'te gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Ekspresyon analizleri için dizayn edilen primerler

Primer Adı	**Primer Dizilimi (5'---3')**	**TM* (^{o}C)**
AMAexF	*CACC*ATGCAGTGCATATTGAATAGG	64,2
AMAexR	TCAGTTGAGCTTAGTCAGGTGTACTGG	68,3

*TM: Erime sıcaklığı

Macrogen (The Netherlands) firmasına sentezlettirilen primerler firmanın önerileri doğrultusunda her birinin konsantrasyonu 100 pmol/ µl olacak şekilde steril deiyonize su ile sulandırılmıştır. Sulandırılan primerler, 1,5 ml'lik bir ependorf tüpüne stok primer solüsyonundan 100 µl miktarında alınarak porsiyonlanmıştır.

PCR reaksiyonununda polimeraz enzimi olarak; doğru eşleşmiş bir baz çiftine gelinceye kadar yanlış eşleşmiş tüm parçaları kesebilen, 3’ uçtan 5’ uca ekzonükleaz aktivitesine sahip, hipertermofilik *Pyrococcus furiosus* adlı bir bakteriden sentezlenmiş “pfu DNA polimeraz” kullanılmıştır. Böylece Taq DNA polimeraz kullanılarak PCR ürünlerinin 3’ ucunda meydana gelebilecek Adenin kalıntısı oluşmasının önüne geçilmiş ve reaksiyon (blunt-end) olarak gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon için 25 µl'lik bir karışım hazırlanmıştır. Bu reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

Tablo 3.6. PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları

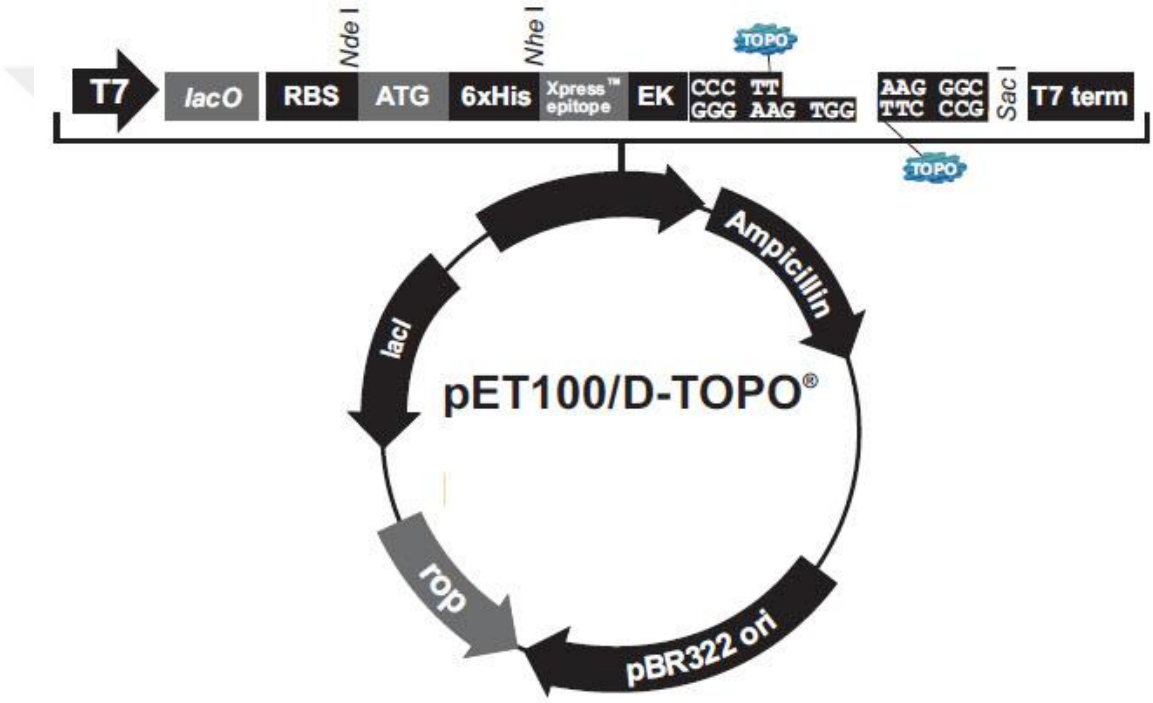
Malzemeler	**Miktarları (**µl)
10X Pfu Buffer with MgSO4	2,5
$MgCl_2$ (25 mM)	2
dNTP Mix (10 mM each)	0,5
AMAexF primeri (100 pmol/µl)	0,35
AMAexR primeri (100 pmol/µl)	0,35
Pfu DNA Polymerase (recombinant, 2,5 u/µl, 500 u)	0,5
Steril Deiyonize su	13,8
cDNA (10 ng/µl)	5
TOPLAM	25

Steril kabin içerisinde hazırlanan PCR reaksiyon karışımı, 0,2 ml'lik DNA'se ve RNA'se free ependorf tüpleri içerisine konulmuştur. Tüpler, thermal cycler cihazına (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, California, USA) yerleştirilerek amplifikasyona tabi tutulmuşlardır. Amplifikasyon için protokol; ön denatürasyon: 95 °C’de 3 dk; 40 siklus, denatürasyon: 95 °C’de 30 sn, bağlanma: 60,9 °C’de 30 s, uzama: 72 °C’de 108 sn; final uzama: 72 °C’de 5 dk olacak şekilde dizayn edilmiştir. PCR testinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla negatif kontrol olarak sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

Elektroforez ile görüntüleme ve jelden ekstraksiyon işlemleri 3.3. PCR Ürünlerinin Elektroforez ile Görüntülenmesi ve 3.4. Jelden Ekstraksiyon İşlemi başlıklarında verildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

3.7.4. pET 100/D-TOPO Ekspresyon Vektörüne Klonlama

pET 100/D-TOPO vektörü (Invitrogen, ABD) N-terminal füzyon peptidine ve 6 tane Histidin (6xHis) proteinini bağlayan, ampisilin dirençli bir ekspresyon vektörüdür. pET 100/D-TOPO (5764 bp) vektörünün haritası Şekil 3.5'de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. pET 100/D-TOPO ekspresyon vektörünün şematik görümü

Klonlamada Champion^{TM} pET Directional TOPO Expression Kit'in (Invitrogen, ABD) önerdiği basamaklar takip edilmiştir.

3.7.4.1. BbigAMA-1 Genlerinin pET 100/D-TOPO Plazmidine Ligasyonu

Ligasyon basamağında hem *in vitro* hem de *in vivo* pasajların BbigAMA-1fragmentinin ilgili plazmide yerleştirilmesi için ticari kitin önerileri doğrultusunda aşağıdaki karışım hazırlanmıştır.

PCR ürünü Jel Pürifiye Örnek	4 µl
Tuz Solüsyonu	1 µl
pET 100 vektör	1 µl
Toplam	6 µl

Karışım, vortekslenip santrifüj edildikten sonra oda ısısında 30 dk inkübe edilmiştir. Takiben transformasyon işlemine geçilmiştir. Plazmidin OneShot TOP 10 *E. coli* hücrelerine (Invitrogen, ABD) transformasyonu 3.5.2. Rekombinant Plazmidin Kompetan Hücrelerine Transformasyonu başlığında açıklandığı gibi yapılmıştır.

3.7.4.2. Klonlamanın PCR Tarama ile Doğrulanması

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plazmidi içerip içermediğini tespit etmek için koloni PCR taraması yapılmıştır. Koloni PCR için 25 µl'lik bir karışım hazırlanmıştır. Bu reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 3.7'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7. PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları

Malzemeler	**Miktarları (µl)**
10XTaq buffer (with $(NH_4)_2SO_4$, 1,25 ml)	2,5
$MgCl_2$ (25 mM)	2
dNTP Mix (10 mM each)	0,5
AMAexF primeri (100 pmol/µl)	0,35
AMAexR primeri (100 pmol/µl)	0,35
Taq DNA Polymerase (recombinant, 5 u/ µl, 500 u)	0,5
Steril Deiyonize su	18,8
Koloni (1 adet)	-
TOPLAM	25

Hazırlanan karışımlar thermal cyclerda protokol; ön denatürasyon: 94 ^{o}C'de 10 dk; 30 siklus, denatürasyon: 95 ^{o}C'de 30 s, bağlanma: 60,9 ^{o}C'de 30 s, uzama: 72 ^{o}C'de 108

sn; final uzama: 72 ^{o}C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR sonucu elde edilen amplikonlar %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile UV ışın altında görüntülenip analiz edilmiştir.

Elde edilen plazmidlerin saflaştırılması işlemi 3.5.5. Rekombinant Plazmidlerin Saflaştırılması başlığında açıklandığı gibi yapılmıştır.

3.7.4.3. Saflaştırılan Rekombinant Plazmidlerin Kontrol PCR'ları

Saflaştırılan rekombinant plazmidin BbigAMA-1 genini içerip içermediği ve N-C terminal uçlarının doğru oryantasyonda yerleşip yerleşmediğinin kontrolü amacıyla çapraz PCR protokolleri uygulanmıştır. Tahmini amplifikasyon sonuçları Geneious R8 (369) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Çapraz kontrol PCR'ları dört farklı şekilde yapılmıştır:

Çapraz PCR 1: Bu PCR işleminde kit içeriğinde bulunan plazmide ait T7 promotor forward ve T7 reverse primerleri kullanılmıştır. Bu PCR sonucunda elde edilen ürün miktarı 2064 bp olması beklenmiş ve ilgili baz aralığında alınan pozitif sonuç BbigAMA-1 geninin plazmiddeki varlığının doğrulanması şeklinde yorumlanmıştır. Bu amaçla PCR için 25 µl'lik bir karışım hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 3.8'de gösterildiği gibi ayarlanmıştır.

Tablo 3.8. PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları

Malzemeler	**Miktarları (**µl)
10XTaq buffer (with $(NH_4)_2SO_4$, 1,25 ml)	2,5
$MgCl_2$ (25 mM)	2
dNTP Mix (10 mM each)	0,5
T7 Promotor Forward (100 pmol/µl)	0,35
T7 Reverse (100 pmol/µl)	0,35
Taq DNA Polymerase (recombinant, 5 u/ µl, 500 u)	0,5
Steril Deiyonize su	17,8
Rekombinant Plazmid	1
TOPLAM	25

Hazırlanan karışımlar thermal cyclerda protokol; ön denatürasyon: 95 ^{o}C'de 3 dk; 30 siklus, denatürasyon: 95 ^{o}C'de 30 s, bağlanma: 45 ^{o}C'de 30 s, uzama: 72 ^{o}C'de 1 dk; final uzama: 72 ^{o}C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR sonucu elde edilen amplikonlar %1.5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile UV ışın altında görüntülenip analiz edilmiştir.

Çapraz PCR 2: Bu PCR işleminde kit içeriğinde bulunan plazmide ait T7 promotor forward ve BbigAMA-1 genine ait AMAexR reverse primerleri kullanılmıştır. Bu PCR sonucunda elde edilen ürün miktarı 1984 bp olması beklenmiş ve ilgili baz aralığında alınan pozitif sonuç BbigAMA-1 geninin N ve C terminal uçlarının doğru bir oryantasyonda vektöre insert olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu amaçla PCR için 25 µl'lik bir karışım hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımında kullanılan malzemelerin miktarları Tablo 3.8'de gösterildiği gibi ayarlanmıştır. Tabloda, farklı olarak sadece primer isimleri değiştirilmiştir.

Hazırlanan karışımlar thermal cyclerda protokol; ön denatürasyon: 95 ^{o}C'de 3 dk; 30 siklus, denatürasyon: 95 ^{o}C'de 30 s, bağlanma: 45 ^{o}C'de 30 s, uzama: 72 ^{o}C'de 2 dk;

final uzama: 72 ^{o}C'de 7 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR sonucu elde edilen amplikonlar %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile UV ışın altında görüntülenip analiz edilmiştir.

Çapraz PCR 3: Bu PCR işleminde kit içeriğinde bulunan plazmide ait T7 promotor forward ve BbigAMA-1 genine ait AMAexF forward primerleri kullanılmıştır. Bu PCR sonucunda herhangi bir baz aralığında pozitiflik olup olmadığı araştırılmış ve alınan negatif sonuç doğrultusunda BbigAMA-1 geninin N ve C terminal uçlarının doğru bir oryantasyonda vektöre insert olduğu tespit edilmiştir. PCR için 25 µl'lik bir karışım hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımında kullanılan malzemelerin miktarları Tablo 3.8'de gösterildiği gibi ayarlanmıştır. Tabloda, farklı olarak sadece primer isimleri değiştirilmiştir.

Thermal profil çapraz PCR 2'de verildiği gibi belirlenmiş ve uygulanmıştır. PCR sonucu elde edilen amplikonlar %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile UV ışın altında görüntülenip analiz edilmiştir.

Çapraz PCR 4: Bu PCR işleminde BbigAMA-1 genine ait AMAexF forward ve AMAexR reverse primerleri kullanılmıştır. Bu PCR sonucunda elde edilen ürün miktarı 1788 bp olması beklenmiş ve ilgili baz aralığında alınan pozitif sonuç BbigAMA-1 geninin plazmiddeki varlığının doğrulanması ve çapraz PCR 1'in tekrar konfirme edilmesi şeklinde yorumlanmıştır. Reaksiyon karışımında kullanılan malzemelerin miktarları Tablo 3.8'de gösterildiği gibi ayarlanmıştır. Tabloda, farklı olarak sadece primer isimleri değiştirilmiştir.

Amplifikasyon için protokol 3.7.3. PCR başlığında verildiği gibi ayarlanmış ve uygulanmıştır. PCR sonucu elde edilen amplikonlar %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile UV ışın altında görüntülenip analiz edilmiştir.

3.7.5. BL21 Star (DE3) *E. coli* Kompotent Hücrelerine Transformasyon

Ekspresyon vektörüne insert olmuş BbigAMA-1 genlerini (her iki suş için ayrı) içeren rekombinant plazmidlerin BL21 Star (DE3) *E. coli* hücrelerine transformasyonu buz üstünde aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır:

1. Her suş için ayrı olmak üzere 2 vial 50 µl BL21 Star (DE3) *E. coli* hücresi buz üstünde eritildi.

2. Eriyen hücrelerin üzerine 5 µl hacimde 5-10 ng plazmid DNA'sı eklendi ve tüplerin dip kısımlarına vurularak hafifçe karıştırıldı.

3. Karışımlar buz üzerinde 30 dk inkübe edildi.

4. İnkubasyon sonrasında karışımlar hızlı bir şekilde oda ısısına maruz kalmadan 42 °C'de 2 dk ısı şokuna tabii tutuldu.

5. Isı şokundan hemen sonra tüpler buz üzerine alınarak, 4 dk inkübe edildi.

6. Tüplerin üzerine 250 µl oda ısısında bekletilmiş S.O.C. medium eklendi.

7. Tüplerin kapağı kapatıldıktan sonra, çalkalayıcılı inkübatörde 200 rpm'de ve 37 °C'de 1,5 saat inkübe edildi.

8. İnkübasyon sonrası transformasyon ürününün tamamı 100 µl/ml ampisilin içeren 10 ml LB sıvı besi yerlerine ekildi ve çalkalayıcılı inkübatörde 110 rpm'de ve 37 °C'de bir gece inkübe edildi.

3.7.6. Pilot Ekspresyon Denemeleri

Pilot ekspresyon denemeleri ideal bir ekspresyon için gerekli olan IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) miktarını ve optimum indükleme saatini belirlemek için yapılmıştır. Sonuçlar, Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ve Western Blot analizleri ile belirlenmiştir. BbigAMA-1'in her iki suş için de ekspresyonu ile ilgili bir bilgi bulunmadığından optimizasyon çalışmaları birkaç kez tekrar edilip ilgili değerler kayıt altına alınmış ve karşılaştırmalı olarak teyit edilmiştir.

3.7.6.1. IPTG Optimizasyonu

1. Başlık 3.7.5'in 8. maddesinde bir gece inkübasyona bırakılan tranformasyonun gerçekleştiği *E. coli* BL21(DE3) bakteri kolonileri içeren LB sıvı besi yerlerinden 2,5 ml, ertesi gün 100 µl/ml ampisilin içeren 50 ml LB sıvı besi yerlerine (iki adet *in vivo* suş ekspresyonu ve iki adet *in vitro* suş ekspresyonu için toplam 4 adet) aktarıldı ve tekrar 37 °C'de çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

2. İnkubasyona bırakılan besi yerlerinden birkaç saat aralıklarla 1 ml örnekler alınarak spektrofotometrede 600,0 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı ve üreyen bakterilerin optik yoğunlukları (OD) ölçüldü.

3. *In vivo* ve *in vitro* suşlar için ayrı hazırlanan 4 adet LB sıvı besi yerlerinin OD_{600} değeri 0,5-0,8 arasında olduğunda her bir 50 ml lik besi yeri 10 ml hacimde 4 adet flaska bölündü. Böylece 1 suş için; 8 adet 10 ml'lik, içinde transformasyonu gerçekleşmiş *E. coli* BL21 (DE3) bulunan, OD_{600} değeri 0,5-0,8 arasında olan LB sıvı besi yeri elde edildi.

4. Her suş için 8'er adet 10 ml hacimde hazırlanan flasklara son konsantrasyonları sırasıyla 0,00001; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1 ve 2 mM olmak üzere IPTG ilave edildi (Şekil 3.6).

5. IPTG içeren besi yerleri 37 °C'de inkubasyona bırakıldı ve ilk konulduğu an dahil olmak üzere (sıfırıncı saat) 6 saat boyunca her saat 1 ml örnek alınıp ependorf tüplerine konuldu.

6. Ependorf tüpleri 15300 rpm'de 1 dk santrifüj edilip, süpernatant kısmı atıldı. Kalan pellet SDS-PAGE analizi yapılmak üzere -20 °C 'de saklandı.



Şekil 3.6. Çalkalayıcılı inkubatörde, 37 °C'de inkubasyona bırakılmış ve IPTG indüklemeleri yapılmış olan LB sıvı besi yerleri

3.7.6.2. SDS-PAGE Analizleri

SDS-PAGE için gerekli kimyasallar ve formülasyonları Laemmli (382)'ye göre aşağıda verildiği gibi hazırlanmıştır:

Acrylamide solüsyon (%30 Acrylamide, %0,8 Bisacrylamide, 200 ml)*:

Acrylamide	60 g
Bisacrylamide	1,6 g
Steril Deiyonize Su	200 ml'e kadar
Toplam	200 ml

*****+4 °C'de 3 ay saklanabilir.

4x Resolving Gel Buffer (1,5 M Tris-Cl, pH 8,8, 200 ml)*:

Tris	36,3 g
Steril Deiyonize Su	150 ml
HCl	pH: 8,8'e ayarlanana kadar
Steril Deiyonize Su	200 ml'e kadar
Toplam	200 ml

*****+4 °C'de 3 ay saklanabilir.

4x Stacking Gel Buffer (0,5 M Tris-Cl, pH 6,8, 50 ml)*:

Tris	3 g
Steril Deiyonize Su	40 ml
HCl	pH: 6,8'e ayarlanana kadar
Steril Deiyonize Su	50 ml'e kadar
Toplam	50 ml

*****+4 °C'de 3 ay saklanabilir.

%10 SDS*:

SDS	3 g
Steril Deiyonize Su	100 ml'e kadar
Toplam	100 ml

*****Oda ısısında 6 ay saklanabilir.

%10 Amonyum persülfat*:

Amonyum persülfat	0,05 g
Steril Deiyonize Su	0,5 ml'e kadar
Toplam	0,5 ml

*****Her analiz için taze hazırlanmalıdır.

%8'lik resolving jel ve %5'lik stacking jel, Sambrook and Russell (383)'a göre Tablo 3.9'da verilen formülasyon ile hazırlanmıştır.

Tablo 3.9. Resolving ve Stacking jelin formülasyonu

Resolving Jel (%8'lik-10 ml)		**Stacking Jel (%5'lik-4 ml)**	
Steril Deiyonize Su	4,6 ml	Steril Deiyonize Su	2,7 ml
Acrylamide solüsyon	2,7 ml	Acrylamide solüsyon	0,67 ml
4x Resolving Gel Buffer	2,5 ml	4x Stacking Gel Buffer	0,5 ml
%10 SDS	0,1 ml	%10 SDS	0,04 ml
%10 Amonyum persülfat	0,1 ml	%10 Amonyum persülfat	0,04 ml
TEMED*	0,006 ml	TEMED*	0,004 ml

*TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine.

Elektroforez bufferı olarak 10X Tris-Glycine SDS Buffer (Thermo Scientific, ABD) 1/10 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

1X SDS-PAGE sample buffer kit içeriğinde verildiği ve aşağıda yazıldığı gibi hazırlanmış ve kullanılana kadar -20 °C muhafaza edilmiştir.

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
Gliserol (%100)	1 ml
β-mercaptoethanol	0,2 ml
Bromophenol Blue	0,01 g
SDS	0,2 g
Steril Deiyonize Su	10 ml'e kadar
Toplam	10 ml

SDS-PAGE analizinin adımları aşağıda verilmiştir:

1. Elektroforez camları kullanılmadan önce su ve alkol (%70'lik ethanol) ile yıkanarak temizlendi ve sonrasında camlar arasında 0,75 mm aralık olacak şekilde sistem oluşturuldu. Öncelikle jelin hazırlanacağı jel dökme aparatı kurulandı ve su ile sızdırmazlık testi yapıldı. Herhangi bir sızdırma olmadığı anlaşıldıktan sonra jel hazırlanma işlemine başlanıldı.

2. Öncelikle manyetik karıştırıcı üzerinde, hava kabarcığı oluşturmadan resolving jel karışımları hazırlandı. Hazırlanan karışım 10 ml'lik otomatik pipet ile çekilerek dikkatli bir şekilde daha önce hazırlanan cam haznenin %75'ini kaplayacak şekilde konuldu (Şekil 3.7).

3. Resolving jel döküldükten sonra polimerleşmenin sağlanması ve jelin üst kısmının düz bir şekil alması için 1 ml steril deiyonize su, resolving jelin üzerine hafifçe eklendi ve takiben 30-60 dk oda ısısında jelin polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra üzerindeki steril deiyonize su nazik bir şekilde döküldü ve kalan su artıkları kurutma kâğıdıyla uzaklaştırıldı.

4. Daha sonra manyetik karıştırıcı üzerinde, hava kabarcığı oluşturmadan stacking jel karışımları hazırlandı. Hazırlanan karışım 5 ml'lik otomatik pipet ile çekilerek dikkatli bir şekilde resolving jelin üzerine döküldü ve taraklar yerleştirdi. 30-45 dk polimerleşme için beklenildi (Şekil 3.7).

5. Jel örnek yüklemeye hazır hale geldikten sonra; çöktürülen pelletlerin ve negatif kontrol olarak kullanılmak üzere -80 °C'den çıkarılıp oda ısısında çözdürülen transformasyon işlemi yapılmamış *E. coli* BL 21 (DE3) hücrelerinin üzerine 100 µl 1X SDS sample buffer eklendi ve homojenizatörde 5 dk karıştırıldı.

6. İyice karışan ve jel kıvamı alan örnekler 99 ^{o}C'de 10 dk inkübe edildi. Böylece proteinlerin denature olması sağlandı.

7. İnkubasyon sonrası örnekler oda ısısında soğutuldu.

8. Taraklar jelden dikkatlice çıkarıldıktan sonra kuyular 1X SDS elektroforez bufferı ile yıkanarak polimerleşmeyen monomerler uzaklaştırıldı.

9. Jeller tanka yerleştirildikten sonra iç ve dış kısım 1X SDS elektroforez bufferı ile doldurulduu.

10. Örneklerden 20 µl alınarak kuyulara yükleme yapıldı. Son kuyucuk protein marker yüklenmesi için boş bırakıldı (Şekil 3.7).

11. Protein büyüklüklerinin belirlenmesi için 5 µl, PageRuler™ Prestained 10-180kDa Protein Ladder (Thermo Scientific, USA) son kuyucuğa yüklendi.

12. Jeller 165 V'da 85 dk yürütüldü (Şekil 3.7).

13. Proteinlerin jel içerisinde ilerlemesi tamamlandıktan sonra, jeller dikkatli bir şekilde iki cam levha arasından çıkarıldı ve steril deiyonize su ile 5'er dk çalkalayıcı üstünde 2 kez yıkandı.

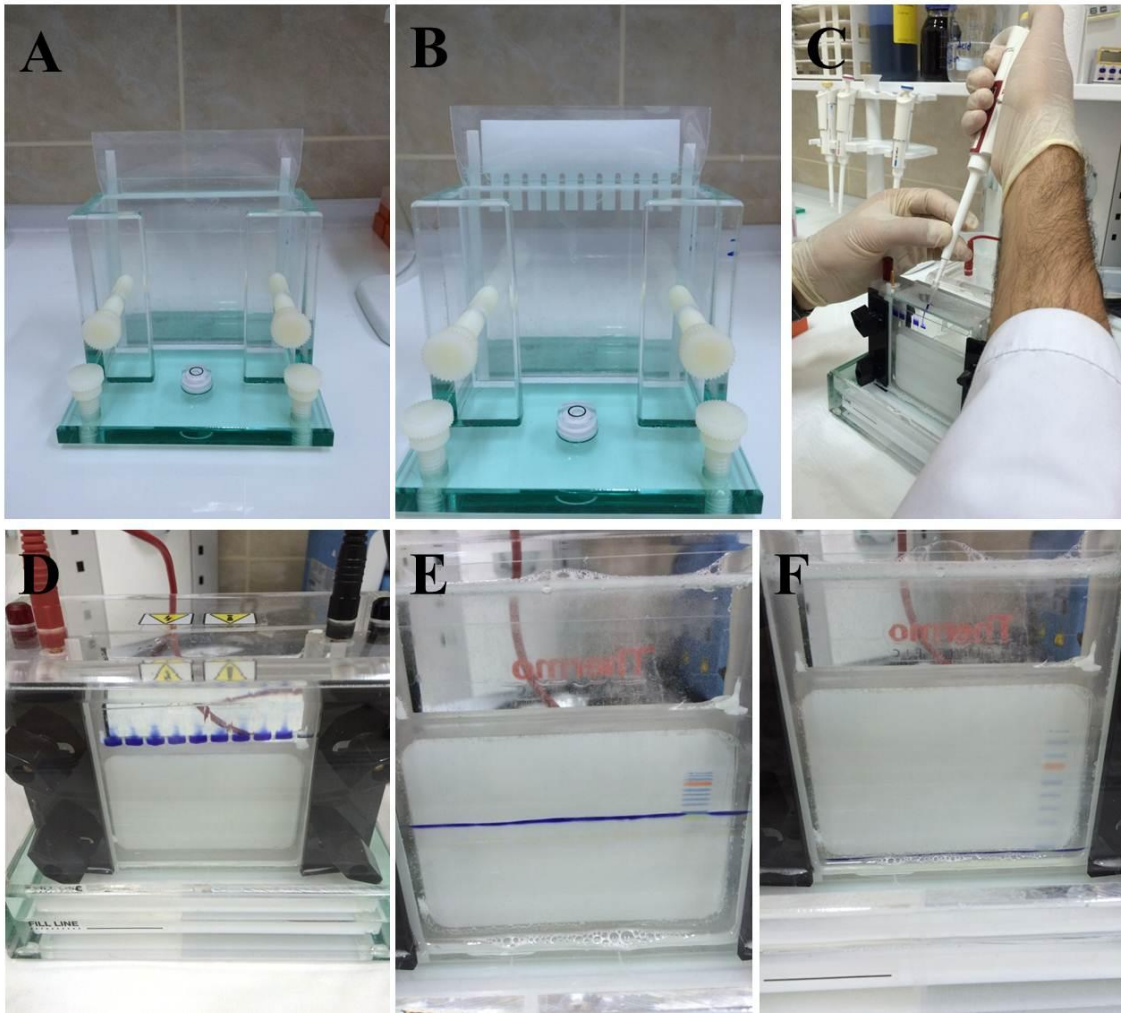
14. Yıkanan jeller boyama solüsyonuna (Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution, Bio-Rad, ABD) transfer edildi.

15. Boyama çözeltisinde bir gece boyunca bırakılan jeller, sonrasında fazla boyanın giderilmesi için aşağıda Sambrook and Russell (383)'a göre formülasyonu verilen jel yıkama çözeltisine (destaining solution) konuldu.

Methanol	250 ml
Steril Deiyonize Su	200 ml
Glacial Asetik Asit	50 ml
Toplam	500 ml

16. Otuz dakika aralıklarla yıkama çözeltisi değiştirildi ve 90 dk sonunda, bantların belirginleştiği görüldü.

17. Fazla boyanın giderilmesi ve jelin eski formuna dönmesi amacıyla jel, steril deiyonize su ile 10'ar dk aralıklarla 2 kez yıkandı ve takiben Fusion FX5 (Vilber Lourmat, Germany) ile görüntülenip analizleri yapıldı.



Şekil 3.7. SDS-PAGE analizleri. A: Resolving jel'in donma süreci; B: Stacking jel ve tarakların yerleştirilmesi; C: Örneklerin yüklenmesi; D, E, F: Elektroforezin başlatılması ve örneklerin yürütülmesi

3.7.6.3. Western Blot Analizleri

Western blot analizleri, 6xHis ile işaretli hedef proteinin belirlenmesi ve ekspresyon optimizasyonunun konfirme edilmesi amacıyla yapılmıştır.

Öncelikle "3.7.6.1. IPTG Optimizasyonu" başlığında yer alan basamaklar takip edilerek elde edilen örneklerin pelletleri "3.7.6.2. SDS-PAGE Analizleri" başlığında yer alan aşamalar takip edilerek dikey elektroforezde yürütülmüş ancak boyama yapılmamıştır. Bu aşamada öncelikle, aşağıda formülasyonları verilen tampon ve çözeltiler hazırlanmış ve takiben jeller, aşağıda verilmiş olan basamaklar takip edilerek Western Blot analizlerine tabii tutulmuştur. Pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanan *Fasciola hepatica* cathepsin L1 saf proteini kullanılmıştır.

Phosphate-Buffered Saline (PBS) Solüsyonu:

PBS tablet (Sigma, Almanya)	5 adet
Steril Deiyonize Su	1000 ml
Toplam	1000 ml

Blocking Buffer:

PBS solüsyonu	500 ml
Tween 20 (Merck, ABD)	250 µl
Skim milk powder (Merck, ABD)	25 g
Toplam	500 ml

Antikor Solüsyonu (1:5000)

Blocking buffer	10000 µl
Anti-HisG-HRP Antikor (İnvitrogen, ABD)	2 µl
Toplam	10002 µl

Yıkama Solüsyonu:

PBS solüsyonu	500 ml
Tween 20 (Merck, ABD)	250 µl
Toplam	~500 ml

3,3′-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) Dilüsuon Buffer'ı (50 mM Tris-HCl, pH: 7,2, 200 ml):

Tris	1, 21 g
Steril Deiyonize Su	190 ml
HCl	pH: 7,2'ye ayarlanana kadar
Steril Deiyonize Su	200 ml'e kadar
Toplam	200 ml

DAB Solüsyonu:

50 mM Tris-HCl (pH:7,2)	20 ml
DAB tozu (Thermo Scientific, ABD)	20 mg
Hidrojen peroksit (30%), (Merck, ABD)	26,6 µl
Toplam	~20 ml

Western Blot basamakları:

1. Jellerin boyutlarına uygun bir şekilde kesilen nitroselülöz membran ve filtre kağıtları (alt ve üst toplam 14 adet), yüzeylerini kaplayacak miktarda Pierce™ 1-Step Transfer Buffer'a (Thermo Scientific, ABD) konularak 15 dk bekletildi.

2. İlk önce 7 adet filtre kağıdı Pierce™ G2 Fast Blotter'ın (Thermo Scientific, ABD) anod (+) tablasına yerleştirildi ve üzerine nitroselülöz membran konuldu. Nitroselülöz membran üzerine poliakrilamid jel yerleştirildi ve en son jel üzerine tekrar filtre kağıtları (7 adet) konularak sandviç oluşturuldu.

3. Sandviç oluşturulduktan sonra tüm hava boşluklarının giderilmesi için yuvarlak bir silindir ile hafif basınç uygulandı.

4. Pierce™ G2 Fast Blotter'ın (Thermo Scientific, ABD) katot (-) tablası sandviçin üzerine kapatılarak semi-dry blotting sisteminin voltu ve süresi ayarlandı.

5. Blotlama 25 V, 2,5 A'de 11 dakika yapıldı.

6. Aktarma yapılmış olan nitroselülöz membran blocking buffer içerisine konulup, 1 gece oda ısısında, çalkalayıcıda inkübe edildi.

7. Blocking solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, membran 20 ml yıkama solüsyonu ile 5'er dakika 5 defa çalkalayıcıda karıştırılarak yıkandı.

8. Membran üzerine 10 ml antikor solüsyonu eklenerek, oda ısısında, çalkalayıcıda, 1 saat inkübe edildi.

9. Antikor solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra membran, 5 defa 20 ml yıkama solüsyonu ile 5'er dakika yıkandı.

10. 20 ml DAB solüsyonu ile bantlar belirginleşinceye kadar çalkalayıcıda inkübe edildi.

11. Bantlar görüldükten sonra, membran iki defa 20 ml distile su ile 2 dk yıkandı.

12. Membran filtre kağıdı üzerine konularak kurutulduktan sonra Fusion FX5 (Vilber Lourmat, Germany) görüntüleme sistemi ile görüntülenip analizleri yapıldı.

3.7.7. Ekspresyon

Pilot ekspresyon denemeleri sonucunda belirlenen optimum IPTG oranı ve indükleme saati, ekspresyon aşamalarında uygulanmıştır. Ekspresyon basamakları aşağıda verildiği gibi yapılmıştır:

1. "3.7.5 BL21 Star (DE3) *E. coli* Kompotent Hücrelerine Transformasyon" başlığında yer alan adımlar izlendi ve bir gece inkübasyona bırakılan tranformasyonun gerçekleştiği *E. coli* BL21(DE3) bakteri kolonileri içeren LB sıvı besi yerlerinden 2,5 ml, ertesi gün 100 µl/ml ampisilin içeren 50 ml LB sıvı besi yerlerine aktarıldı. Takiben besi yerleri 37 °C'de 100 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Ekspresyon öncesi LB besi yerlerinin hazırlanması ve 37 °C'de 100 rpm'de inkubasyon periyodu

2. İnkubasyona bırakılan besi yerlerinden birkaç saat aralıklarla 1 ml örnekler alınarak spektrofotometrede 600,0 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı ve üreyen bakterilerin OD değerleri ölçüldü.

3. *In vivo* ve *in vitro* suşlar için ayrı hazırlanan LB sıvı besi yerlerinin OD_{600} değeri 0,5-0,8 arasında olduğunda (Şekil 3.9) ekspresyonu başlatmak amacıyla *in vivo* suş için final konsantrasyon 0,00001 mM, *in vitro* suş için ise final konsantrasyon 0,01 mM olmak üzere IPTG eklendi.



Şekil 3.9. LB sıvı besiyerinde üreyen *E. coli* BL21 (DE3) bakterilerinin OD_{600} değerlerinin spektrofotometrede ölçümü

4. IPTG içeren *E. coli* BL21 bakterilerinin, 37 ^{0}C'de çalkalayıcı inkubatörde inkübasyonlarına devam edildi.

5. *In vivo* suş için hazırlanan *E. coli* BL21 bakterilerinin eksprese olduğu 50 ml'lik sıvı besi yerleri 2. saatte, *in vitro* suş için hazırlanan *E. coli* BL21 bakterilerinin eksprese olduğu 50 ml'lik sıvı besi yerleri ise 5. saatte inkübatörden çıkarıldı.

6. İnkubatörden çıkarılan 50 ml'lik besi yerlerinden santrifüj öncesi kontrol amacıyla 1 ml örnek alındı. Daha sonra tüm besi yerleri, +4 ^{0}C'de, soğutmalı santrifüjde (Sigma 3K15, Almanya) 4000 rpm de 10 dk santrifüj yapıldı.

7. Alınan 1 ml'lik örnekler ise 15300 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı ve süpernatantları atıldıktan sonra "3.7.6.3 Western Blot Analizleri" başlığında bahsedildiği gibi Western Blot analizlerine tabii tutuldu. Ekspresyon kontrol edildi.

8. Tüm örnekler santrifüj edildikten sonra tüplerdeki süpernatantlar atıldı ve pelletler protein pürifikasyon çalışmalarına kadar -80 ^{0}C'de muhafaza altına alındı.

3.8. REKOMBİNANT BBIGAMA-1 PROTEİNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Babesia bigemina'nın *in vivo* ve *in vitro* pasajlarından elde edilmiş Kayseri/Türkiye suşlarının, 6xHis ile işaretli rekombinant proteinlerinin saflaştırılması ProBond™ Purification System kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Öncelikle "3.7.7 Ekspresyon" başlığının 7. maddesinde bahsedilen, kontrol amaçlı santrifüj sonrası elde

edilen pelletler, Western Blot analizleri ile ekspresyonun başarılı olup olmadığı yönünden test edilmiş ve ilgili protein bantlarının görülmesi ile birlikte ekspresyonun başarılı olduğu kanaatine varılarak saflaştırma işlemlerine geçilmiştir.

Saflaştırma üretici firmanın önerileri doğrultusunda "denaturing condition" protokolleri takip edilerek oda ısısında aşağıda yazıldığı gibi yapılmıştır:

Bakteriyel hücre lizatlarının hazırlanması:

1. Saflaştırma protokollerine başlamadan önce kullanılacak kimyasalların pH değerleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda kontrol edildi ve kit içeriğinde yazılan pH değerlerine göre özenli ve dikkatli bir şekilde ayarlandı.

2. "3.7.7 Ekspresyon" başlığının 6. maddesinde 50 ml'den elde edilen hücre pelletleri saflaştırma işlemleri öncesinde -80 ^{0}C de muhafaza edildiği derin dondurucudan çıkarıldı (her suş için bir adet, toplam iki adet) ve oda ısısında erimeye bırakıldı.

3. pH değeri 37 ^{0}C sıcaklıkta 7,8'e ayarlanan Guanidinium lysis buffer'dan 8 ml hücre pelletlerinin üzerine eklendi.

4. Tüpler yavaş bir şekilde ters-düz edilerek hücrelerin Guanidinium lysis buffer ile resüspense ve lize olması sağlandı.

5. Daha sonra örnekler buz üstüne alındı ve bakteri hücre duvarını parçalamak için sonikatör cihazında 1 dk 15 sn boyunca; 15 sn süre (15 sn çalışıp, 15 sn bekleme) ile yüksek frekansta (%100 power) sese maruz bırakıldı.

6. Örnekler soğutmalı santrifüjde (Sigma 3K15, Almanya) +4 ^{0}C'de 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.

7. Santrifüj sonrası süpernatant alınarak yeni tüplere aktarıldı ve ProBond™ kolonları hazırlanana kadar +4 ^{0}C'de muhafaza edildi.

8. Lizis işleminin başarılı olup olmadığının tespiti için kalan pelletten, yaklaşık 20 µl örnek alındı ve Western Blot analizleri yapılana kadar +4 ^{0}C'de saklandı.

ProBond™ kolonlarının hazırlanması

1. +4 °C'de saklanan ProBond™ Nickel-Chelating Resin oda ısısında ters-düz edilerek homojen hale getirildi.

2. Kit içeriğinde mevcut olan 10 ml'lik pürifikasyon kolonlarının içine homojen haldeki ProBond™ Nickel-Chelating Resin'den 2 ml eklendi ve oda ısısında 5-10 dk beklenerek resinin kolona yerleşmesi sağlandı.

3. Kolonlar soğutmalı santrifüjde (Sigma 3K15, Almanya) +4 ^{0}C'de 800 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

4. Santrifüj sonrası üst kısımda toplanan sıvı resine dikkat edilerek pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.

5. Daha sonra kolonlara 6 ml steril deiyonize su eklendi ve kapakları kapatılarak resinin resüspanse olması için yavaşça ters-düz edildi.

6. Resin ve steril deiyonize su tamamen karıştıktan sonra kolonlar tekrar soğutmalı santrifüjde (Sigma 3K15, Almanya) +4 °C'de 800 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

7. Santrifüj sonrası üst kısımda toplanan sıvı resine dikkat edilerek pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.

8. 5, 6 ve 7. basamaklar tekrar edildi.

9. Daha sonra kolonlara 6 ml denaturing binding buffer eklendi ve kapakları kapatılarak resinin resüspanse olması için yavaşça ters-düz edildi.

10. Resin ve denaturing binding buffer tamamen karıştıktan sonra kolonlar soğutmalı santrifüjde (Sigma 3K15, Almanya) +4 °C'de 800 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

11. Santrifüj sonrası üst kısımda toplanan sıvı resine dikkat edilerek pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.

12. 9, 10 ve 11. basamaklar tekrar edildi.

Denature kondisyonda protein pürifikasyonu

Denature kondisyonda protein pürifikasyonu için; denaturing bufferlar, kolonlar ve hücre lizatları kullanılarak aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir:

1. "Bakteriyal hücre lizatlarının hazırlanması" başlığının 7. maddesinde hazırlanan her bir lizattan 8 ml alındı ve hazır haldeki ProBond™ kolonlarına eklendi.

2. Kolon içerisindeki ProBond™ Nickel-Chelating Resin ile lizatın bağlanması ve resinin lizat solüsyonu içerisinde süspanse olması için kolonlar, oda ısısında 30 dk boyunca yavaşça bir şekilde ters-düz edildi.

3. 30 dk sonunda kolonlar soğutmalı santrifüjde (Sigma 3K15, Almanya) +4 °C'de 800 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

4. Santrifüj sonunda üstte biriken sıvının bir kısmı (~1 ml) Western Blot analizleri için ayrıldı ve +4 °C'de saklandı. Kalan süpernatant ise kolondan uzaklaştırıldı.

5. Kolonlara 4 ml denaturing binding buffer eklendi ve kapakları kapatılarak resinin resüspanse olması için 2 dk boyunca yavaşça ters-düz edildi.

6. Resin ve denaturing binding buffer tamamen karıştıktan sonra kolonlar soğutmalı santrifüjde (Sigma 3K15, Almanya) +4 °C'de 800 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

7. Santrifüj sonunda üstte biriken sıvının bir kısmı (~1 ml) Western Blot analizleri için ayrıldı ve +4 °C'de saklandı. Kalan süpernatant ise kolondan uzaklaştırıldı.

8. 5, 6 ve 7. basamaklar tekrarlandı.

9. Kolonlara 4 ml denaturing wash buffer (pH: 6,0) eklendi ve kapakları kapatılarak resinin resüspanse olması için 2 dk boyunca yavaşça ters-düz edildi.

10. Resin ve denaturing wash buffer tamamen karıştıktan sonra kolonlar soğutmalı santrifüjde (Sigma 3K15, Almanya) +4 °C'de 800 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

11. Santrifüj sonunda üstte biriken sıvının bir kısmı (~1 ml) Western Blot analizleri için ayrıldı ve +4 °C'de saklandı. Kalan süpernatant ise kolondan uzaklaştırıldı.

12. 9, 10 ve 11. basamaklar tekrarlandı.

13. Kolonlara 4 ml denaturing wash buffer (pH: 5,3) eklendi ve kapakları kapatılarak resinin resüspanse olması için 2 dk boyunca yavaşça ters-düz edildi.

14. Resin ve denaturing wash buffer tamamen karıştıktan sonra kolonlar soğutmalı santrifüjde (Sigma 3K15, Almanya) +4 °C'de 800 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

15. Santrifüj sonunda üstte biriken sıvının bir kısmı (~1 ml) Western Blot analizleri için ayrıldı ve +4 °C'de saklandı. Kalan süpernatant ise kolondan uzaklaştırıldı.

16. 13, 14 ve 15. basamaklar 3 kere daha tekrarlandı.

17. Kolonlar vertikal pozisyona getirildikten sonra uç kısımlarındaki tıkaçlar çıkarıldı ve altlarına protein fraksiyonlarının toplanacağı steril 15 ml'lik tüpler yerleştirildi.

18. Üst kısımdan 5 ml denaturing elution buffer eklenerek kolondan ayrılan rekombinant proteinlerin steril tüplere toplanması sağlandı.

19. Elde edilen proteinlerin konsantrasyonu Qubit® 3,0 Fluorometer (Thermo Scientific, ABD) ile ölçüldü.

3.8.1. ProBond™ Nickel-Chelating Resin ile Protein Bağlanmalarının Western Blot Analizleri ile Kontrolü

"Bakteriyel hücre lizatlarının hazırlanması" ve "Denature kondisyonda protein pürifikasyonu" başlıklarında yer alan basamaklarda, Western Blot analizleri için ayrılan ve +4 °C'de muhafaza edilen örnekler, pürifikasyon aşamasında oluşması muhtemel protein kayıplarının kontrolü ve basamakların hatasız bir şekilde uygulandığının doğrulanması amacıyla Western Blot analizlerine tabii tutulmuşlardır. Analizler, "3.7.6.3 Western Blot Analizleri" başlığında verildiği gibi yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak pilot ekspresyon denemelerinde eksprese olduğu belirlenen BbigAMA-1 proteinleri kullanılmıştır.

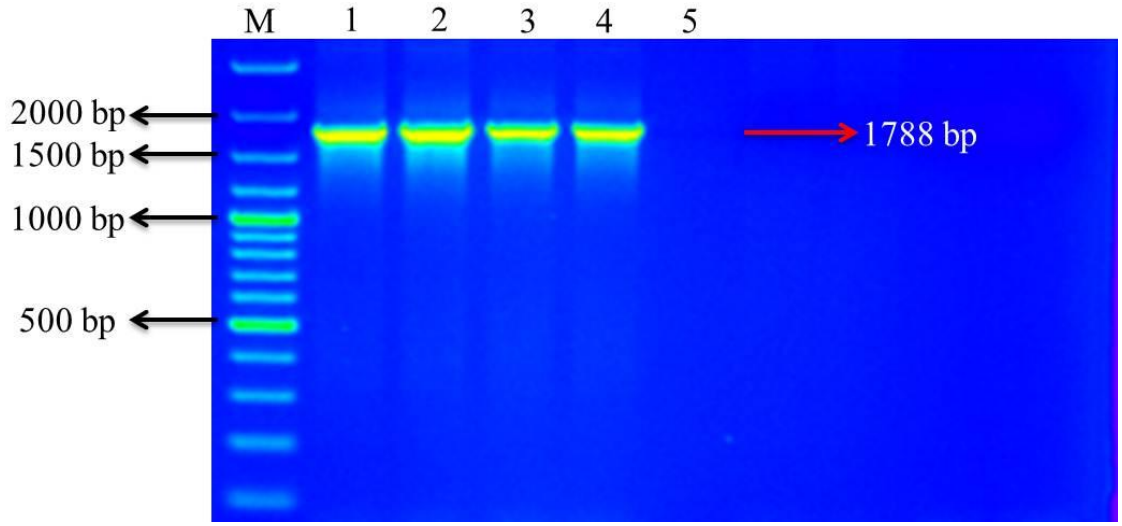
3.8.2. Saflaştırılmış BbigAMA-1 Rekombinant Proteinlerinin Western Blot Analizleri ile Kontrolü

Saflaştırma işlemleri sonrası elde edilen rekombinant proteinler, denatüre formlarında monomer yapılarının gözlenebilmesi, pürifikasyon işleminin kontrol edilmesi ve moleküler ağırlıkların belirlenmesi amacıyla denatüre edilerek Western Blot analizlerine tabii tutulmuşlardır. Analizler, "3.7.6.3 Western Blot Analizleri" başlığında verildiği gibi yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak pilot ekspresyon denemelerinde eksprese olduğu belirlenen BbigAMA-1 proteinleri kullanılmıştır.

4. BULGULAR

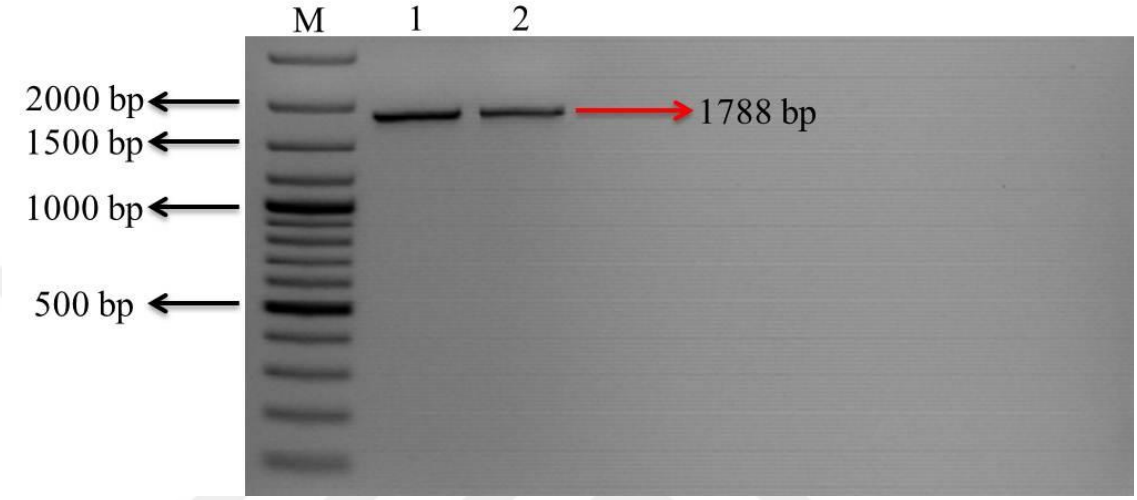
4.1. AMA-1 GEN BÖLGESİNİN PCR AMPLİFİKASYON SONUCU

Babesia bigemina'nın *in vivo* ve *in vitro* pasajlarından elde edilmiş Kayseri/Türkiye suşlarının gDNA'ları, BbigAMA-1 geninin amplifikasyonu amacıyla PCR işlemlerine tabii tutulmuştur. PCR sonrası elde edilen amplikonlar %1,5'luk agaroz jelde CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı ile görüntülenmiş ve 1788 bp büyüklüğünde bant veren DNA fragmentleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *Babesia bigemina*'nın *in vivo* ve *in vitro* pasajlarından elde edilmiş Kayseri/Türkiye suşları gDNA'larının, BbigAMA-1'i kodlayan gen bölgelerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü. M: Marker; 1-2: *B. bigemina in vivo* örnek (ikili yükleme); 3-4: *B. bigemina in vitro* örnek (ikili yükleme); 5: Negatif kontrol

Elektroforez görüntüleme sonucunda hedef baz aralığında görünen bantlar, ilgili genin klonlanması öncesinde jelden ekstrakte edilmiştir. Jel ekstraksiyon sonucu elde edilen örnekler %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı ile görüntülenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Jel ekstraksiyon sonucu elde edilen örneklerin jel elektroforezde görüntüsü. M: Marker; 1: *B. bigemina in vivo* jel pürifiye örnek; 2: *B. bigemina in vitro* jel pürifiye örnek

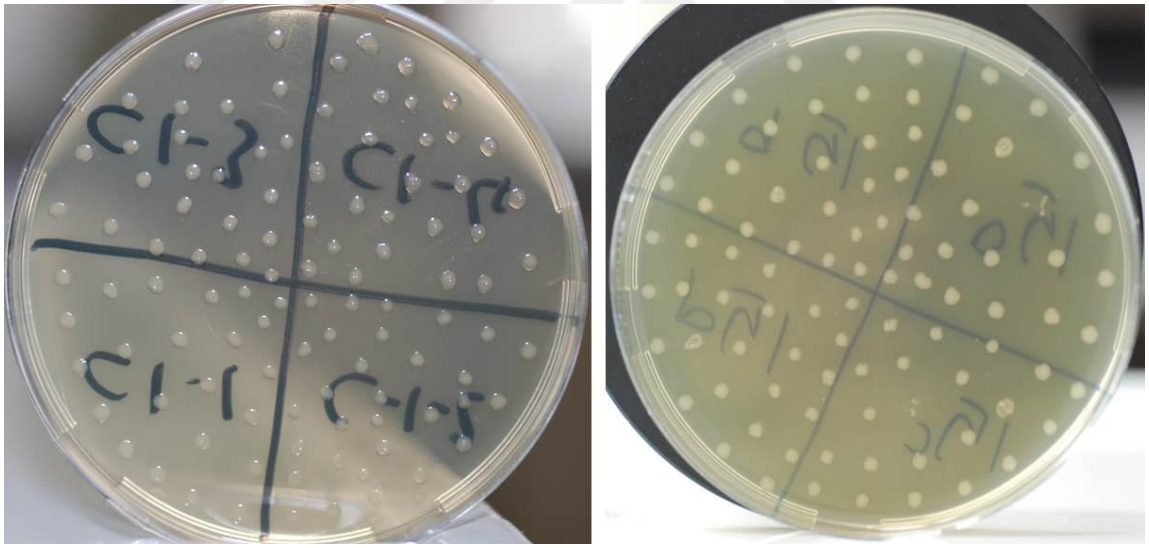
4.2. BBIGAMA-1 GENİNİN KLONLANMA SONUÇLARI

Babesia bigemina'nın *in vivo* ve *in vitro* pasajlarından elde edilmiş Kayseri/Türkiye suşlarının BbigAMA-1'i kodlayan gen bölgelerinin amplifikasyonu ve jelden ekstraksiyonu sonucu elde edilen jel pürifiye örnekler CloneJET PCR Clonning Kit (Thermo Scientific, USA) kullanılarak pJET1.2/blunt CloningVector'e (50 ng/ µl) klonlanmıştır. Daha sonra ligasyon ürünü OneShot TOP 10 *E. coli* (Invitrogen, ABD) kompetan hücrelere transforme edilmiştir. Bir gece inkübasyon sonrası ampicilin LB besi yerinde oluşan koloniler Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



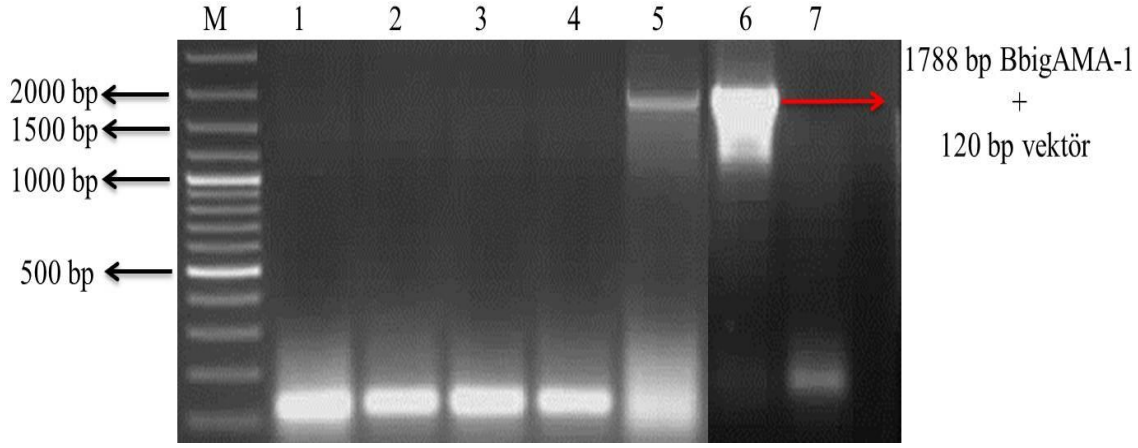
Şekil 4.3. Transformasyon sonucu besi yerinde oluşan koloniler

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerden seçilen tek koloniler, transformasyon etkinliğini artırmak amacıyla steril pipet uçları ile alınıp ayrı ayrı tekrar LB katı besiyerine ekilmiştir. Tekrar 37 ^{o}C'de 1 gece inkübe edilen kolonilerin katı besiyerinde görünümleri Şekil 4.4'te verilmiştir.



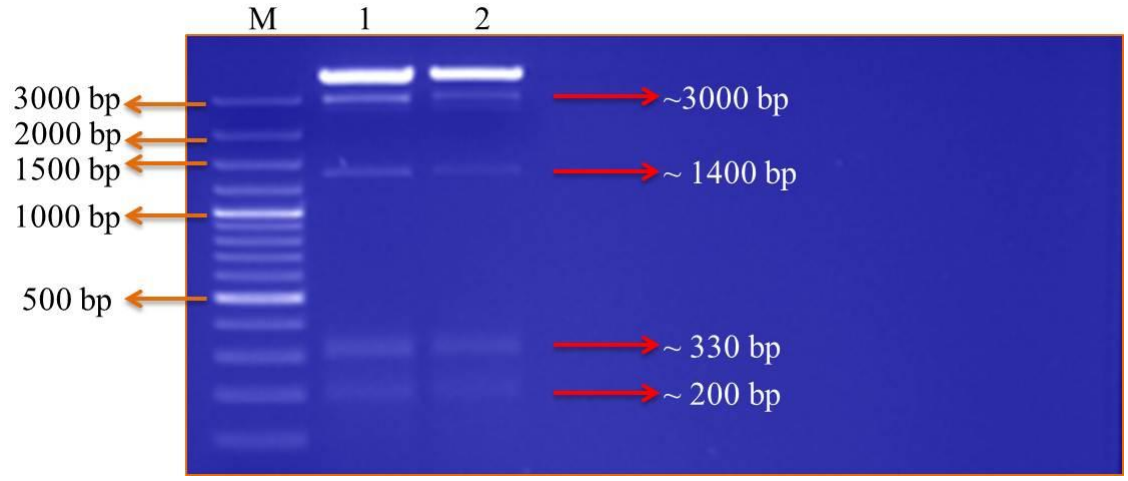
Şekil 4.4. Transformasyon basamağında 2. inkübasyon sonrası oluşan koloniler

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerde hedef gen bölgesinin vektöre insert olduğu ve transformasyon etkinliği vektör spesifik primerlerle koloni PCR yapılarak teyit edilmiştir. BbigAMA-1 geninin koloni PCR sonuçları elde edilen agaroz jel görüntüsü Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Agaroz jelin CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı ile incelenmesi sonucu BbigAMA-1'in her iki suş için de başarılı bir şekilde transforme olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Transforme hücrelerde BbigAMA-1 genlerinin koloni PCR'ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü. M: Marker; 1-4, 7: Negatif koloniler; 5: *in vitro* BbigAMA-1 genini içeren pozitif koloni; 6: *in vivo* BbigAMA-1 genini içeren pozitif koloni

Koloni PCR sonuçlarını takiben ilgili gen bölgeleri yönünden pozitif saptanan tek bir koloni seçilerek sıvı besi yerine aktarılmış, bir gece 37°C'de inkubasyondan sonra üreyen tronsforme hücreler santrifüj ile çöktürülmüştür. Daha sonra transforme hücrelerden plazmid pürifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan rekombinant plazmidler, *Ava I* ve *Xba I* (Thermo Scientific, ABD) restriksiyon enzimleri ile kesilerek klonlanan genin varlığı yönünden %1,5'luk jelde CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı ile görüntülenmiş ve gen içeren rekombinant plazmidler doğrulanmıştır (Şekil 4.6).



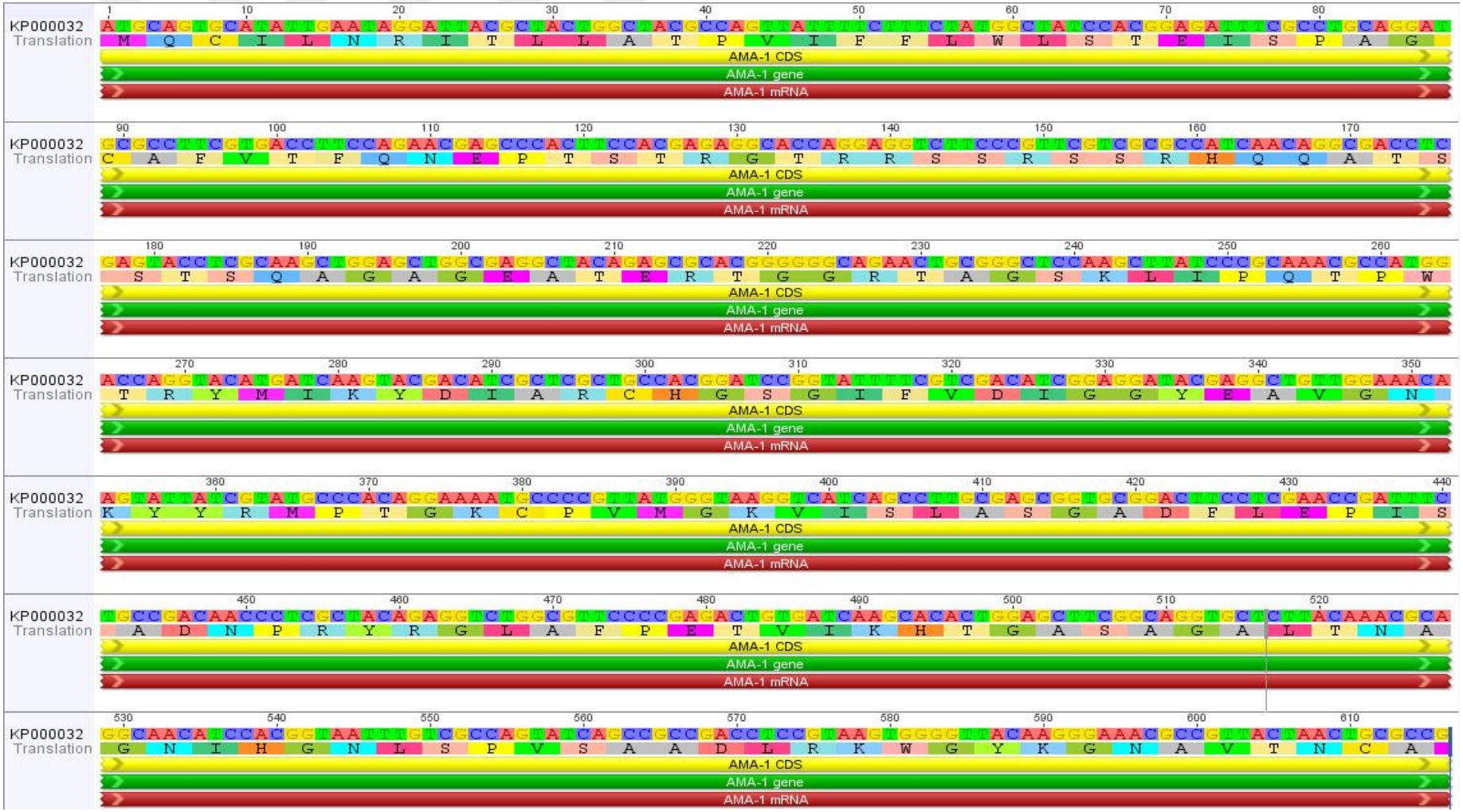
Şekil 4.6. Saflaştırılan plazmidlerin restrüksiyon enzimleri (*Ava 1* ve *Xba 1*) ile kesimi sonucu BbigAMA-1 rekombinant plazmidlerin agaroz jelde kesim yerlerinin görünümü. M: Marker; 1: *in vitro* BbigAMA-1 rekombinant plazmidi; 2: *in vivo* BbigAMA-1 rekombinant plazmidi

Doğrulama analizleri kapsamında plazmid DNA'ların amplifikasyonu pJET1.2 Forward ve pJET1.2 Reverse primerlerinin kullanıldığı PCR analizleri ile de yapılmış ve elde

edilen amplikonların %1,5'luk agaroz jelde yürütülüp CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile UV ışın altında görüntülenmesi sonucu hedef bant profilleri görülmüştür. Böylece saflaştırılan rekombinant plazmidlerin klonlanan BbigAMA-1 genlerini içerdikleri ispatlanmıştır.

4.3. KLONLANAN BBIGAMA-1 GENİNİN SEKANS, FİLOGENETİK, SNPS VE AÇIK OKUMA ÇERÇEVESİ (ORF) ANALİZLERİ SONUÇLARI

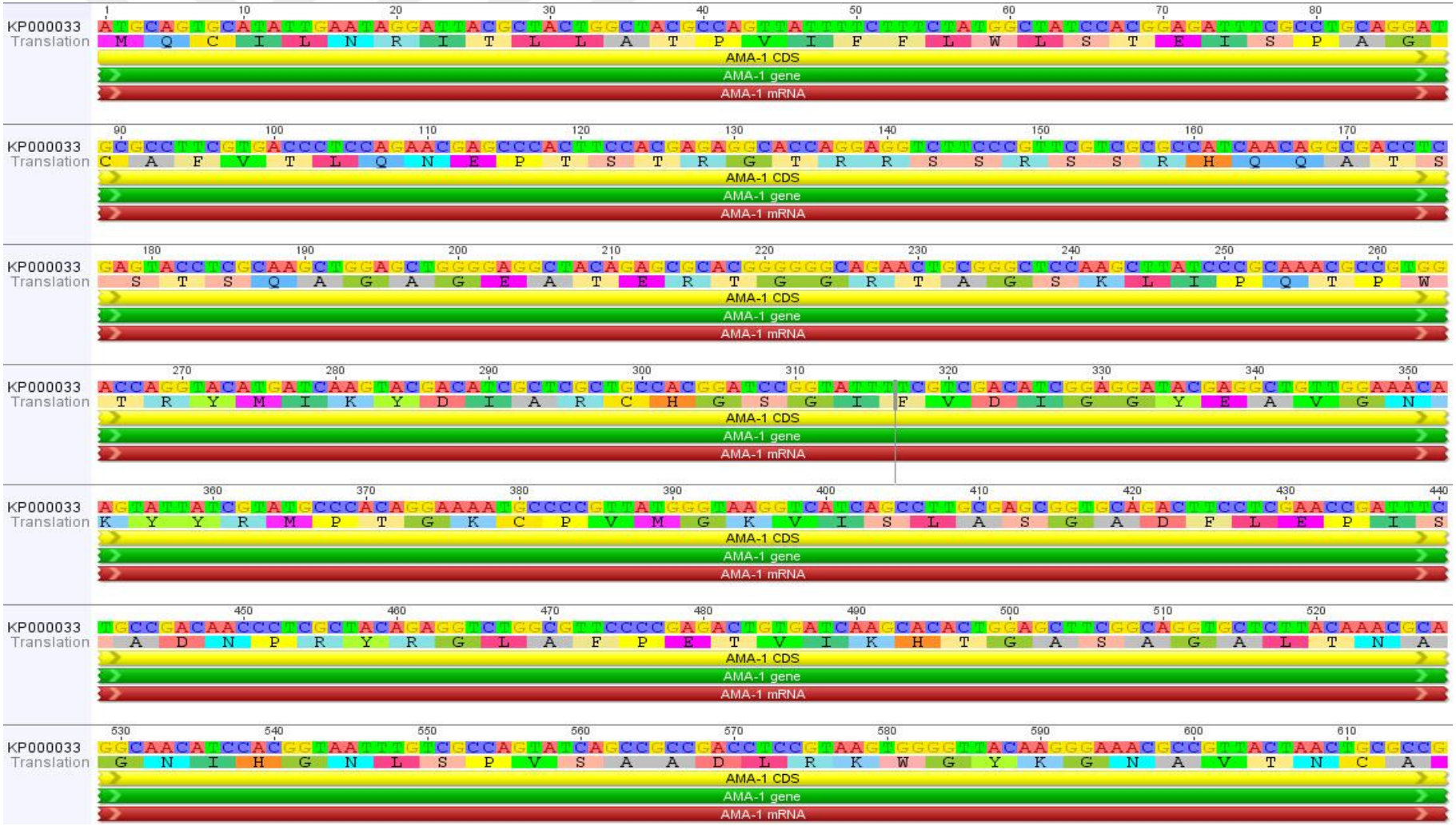
Her iki suş için BbigAMA-1 geninin klonlanması sonucu elde edilen plazmidler, vektör spesifik primer çifti ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Elde edilen nükleotid ve amino asit dizileri vektör sekansı ile alignment yapılarak ilgili gen bölgesinin sekansları elde edilmiştir. *B. bigemina* Kayseri/Türkiye *in vivo* pasajlanmış suşunun AMA-1 geni nükleotit dizisi KP000032, *in vitro* pasajlanmış suşunun AMA-1 geni nükleotit dizisi ise KP000033 aksesyon numaraları ile GenBank'a kayıt edilmiştir. Her iki suşa ait nükleotid ve amino asit kompozisyonları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.

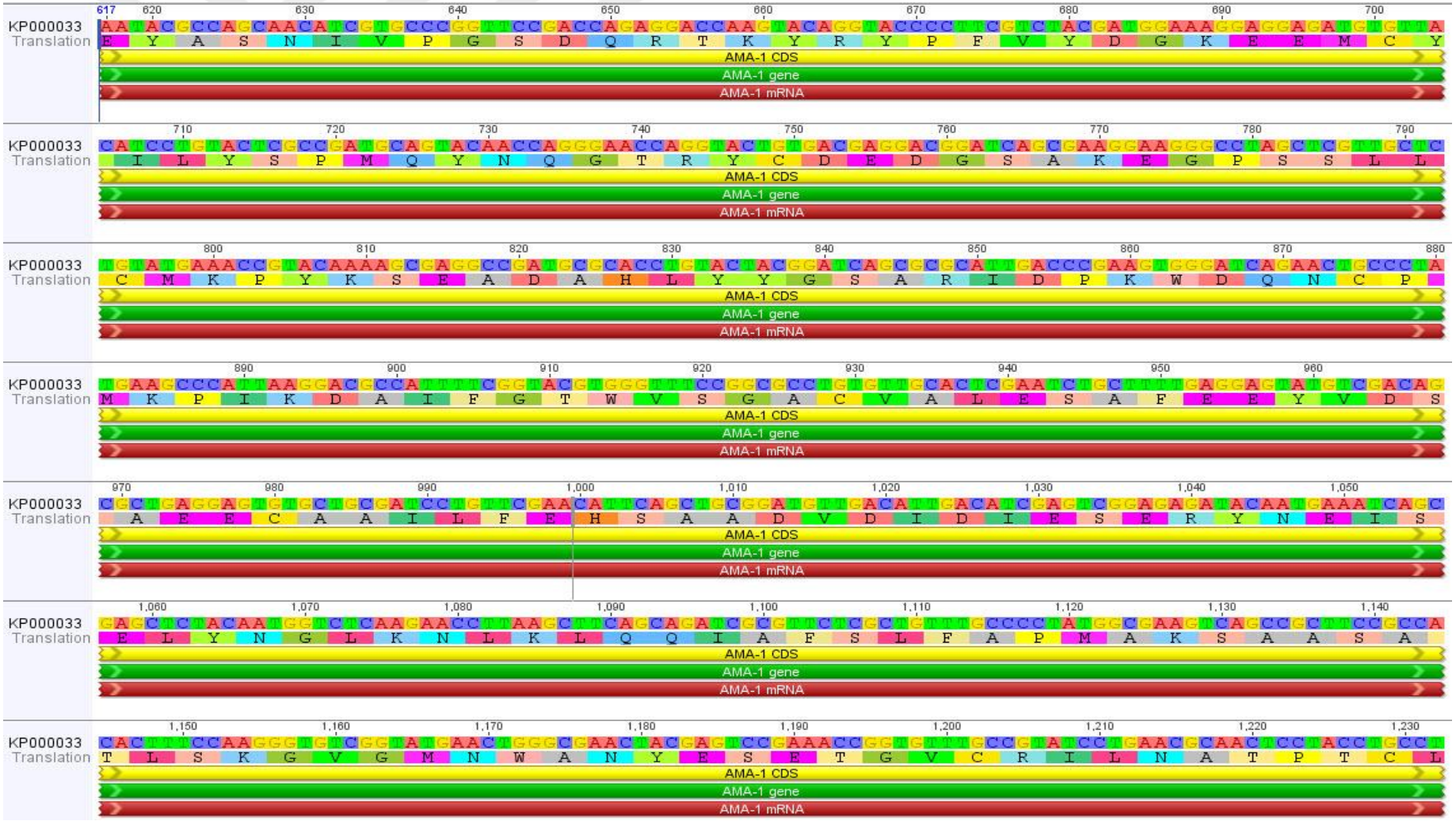

KP000032
Translation
AMA-1 CDS
AMA-1 gene
AMA-1 mRNA


KP000032
Translation
AMA-1 CDS
AMA-1 gene
AMA-1 mRNA



Şekil 4.7. *B. bigemina* Kayseri/Türkiye *in vivo* pasajlanmış suşunun AMA-1 geni nükleotit ve amino asit dizisi (Kayseri/Turkey IV1-KP000032)


KP000033
Translation
AMA-1 CDS
AMA-1 gene
AMA-1 mRNA


KP000033
Translation
AMA-1 CDS
AMA-1 gene
AMA-1 mRNA



Şekil 4.8. *B. bigemina* Kayseri/Türkiye *in vitro* pasajlanmış suşunun AMA-1 geni nükleotit ve amino asit dizisi (Kayseri/Turkey IT2-KP000033)

Elde edilen sekansların BLASTN (370) analizleri yapıldıktan sonra GenBank'a kayıtlı, BbigAMA-1 geninin tamamını içeren nükleotid dizilimine ve AMA-1'i kodlayan amino asit dizilimine sahip, Dünya'daki diğer izolatlar ile çoklu hizalamaları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur. Analize dahil edilen kayıtlı izolatların aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank veri tabanından alınarak Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Filogenetik kıyaslamalarda kullanılan, GenBank'a kayıtlı, BbigAMA-1 geninin nükleotid dizilimlerini içeren izolatların aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

No	Aksesyon Numarası	Protein ID	İzolat İsmi	Orijin
1	HM543730	ADP02977	ITA8CT	İtalya
2	HM543729	ADP02976	ITA7PA	İtalya
3	HM543728	ADP02975	ITA6PA	İtalya
4	HM543727	ADP02974	ITA5RG	İtalya
5	HM543726	ADP02973	ITA4PG	İtalya
6	KU557538	AMP42536	MH-3662-A	İsrail
7	KU557535	AMP42533	Gazit 464	İsrail
8	JN572801	AET36932	Turkey	Türkiye
9	JN572800	AET36931	Rio Grande da Sur	Brezilya
10	JN572799	AET36930	Corrientes	Arjantin
11	JN572798	AET36929	Mexico	Meksika
12	JN572797	AET36928	M1A	Meksika
13	JN572796	AET36927	M1P	Meksika
14	JN572795	AET36926	SP3	Meksika
15	AB481200	BAH22706	Argentina	Arjantin
16	XM_012911354	XP_012766808	Bond	A.B.D
17	GQ257740	ACT46062	ITA3	İtalya
18	GQ257739	ACT46061	ITA2	İtalya
19	GQ257738	ACT46060	ITA1	İtalya

Dünyanın çeşitli ülkelerinden çoklu hizalama analizlerine dahil edilen ve çalışmamızdan elde edilen izolatların BbigAMA-1 geni nükleotid kompozisyonları Tablo 4.2'de ikili hizalama benzerlikleri (pairwise distance) ise Tablo 4.3'de verilmiştir.

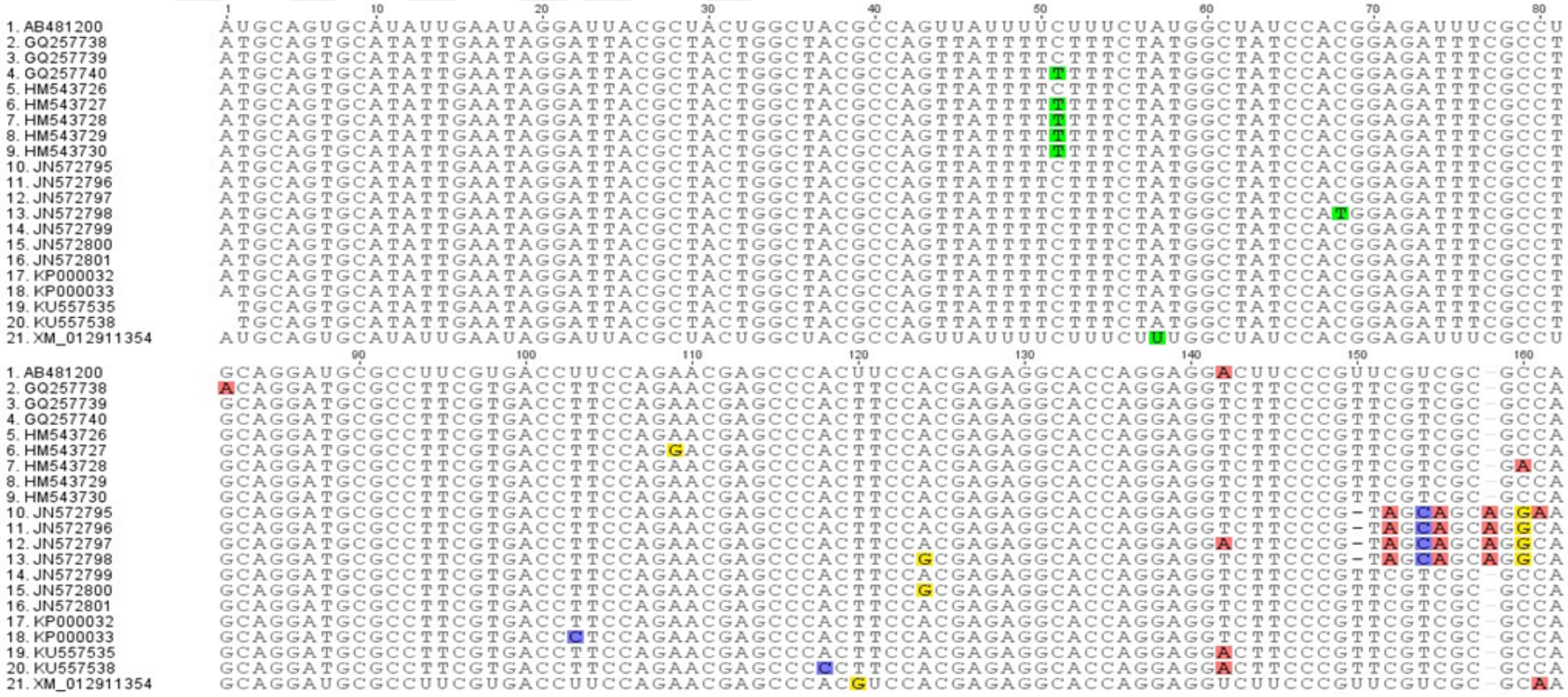
Tablo 4.2. Çoklu hizalama analizlerine dahil edilen izolatların BbigAMA-1 geni nükleotid kompozisyonları

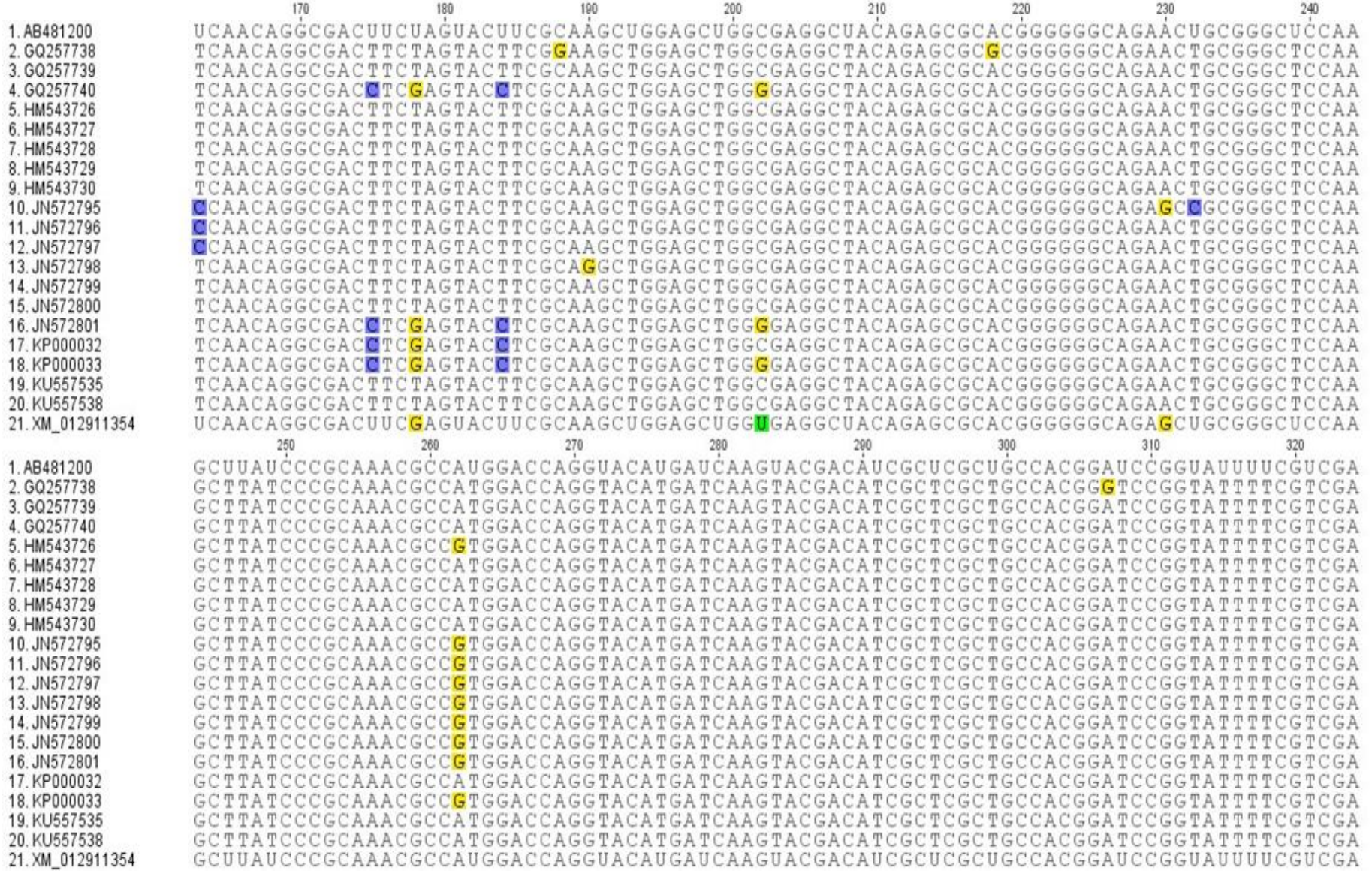
İzolat Aksesyon No	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)	Toplam nükleotid sayısı
AB481200	21,2	27,7	24,2	26,9	45,4	54,6	1788,0
GQ257738	21,3	27,8	24,2	26,8	45,4	54,6	1788,0
GQ257739	21,1	27,9	24,3	26,7	45,4	54,6	1788,0
GQ257740	21,1	27,8	24,1	27,0	45,2	54,8	1788,0
HM543726	21,2	27,8	23,9	27,1	45,1	54,9	1788,0
HM543727	21,3	27,9	24,1	26,7	45,4	54,6	1788,0
HM543728	21,4	27,7	24,2	26,7	45,6	54,4	1788,0
HM543729	21,3	27,9	24,0	26,8	45,3	54,7	1788,0
HM543730	21,4	27,7	24,2	26,7	45,5	54,5	1788,0
JN572795	20,8	28,3	23,9	26,9	44,8	55,2	1785,0
JN572796	20,8	28,1	24,1	27,0	44,9	55,1	1785,0
JN572797	20,7	28,0	24,3	27,0	45,0	55,0	1785,0
JN572798	21,0	28,0	24,1	27,0	45,0	55,0	1785,0
JN572799	21,0	27,8	24,2	27,0	45,2	54,8	1788,0
JN572800	21,2	27,9	24,1	26,8	45,3	54,7	1788,0
JN572801	21,0	28,0	24,2	26,8	45,2	54,8	1788,0
KP000032	21,0	28,0	24,2	26,7	45,2	54,8	1788,0
KP000033	21,0	28,0	24,2	26,8	45,2	54,8	1788,0
KU557535	21,2	28,0	24,2	26,6	45,3	54,7	1787,0
KU557538	21,2	28,0	24,2	26,6	45,4	54,6	1787,0
XM_012911354	21,1	27,8	24,2	26,9	45,3	54,7	1788,0
Ortalama	**21,1**	**27,9**	**24,1**	**26,8**	**45,2**	**54,8**	**1787,3**

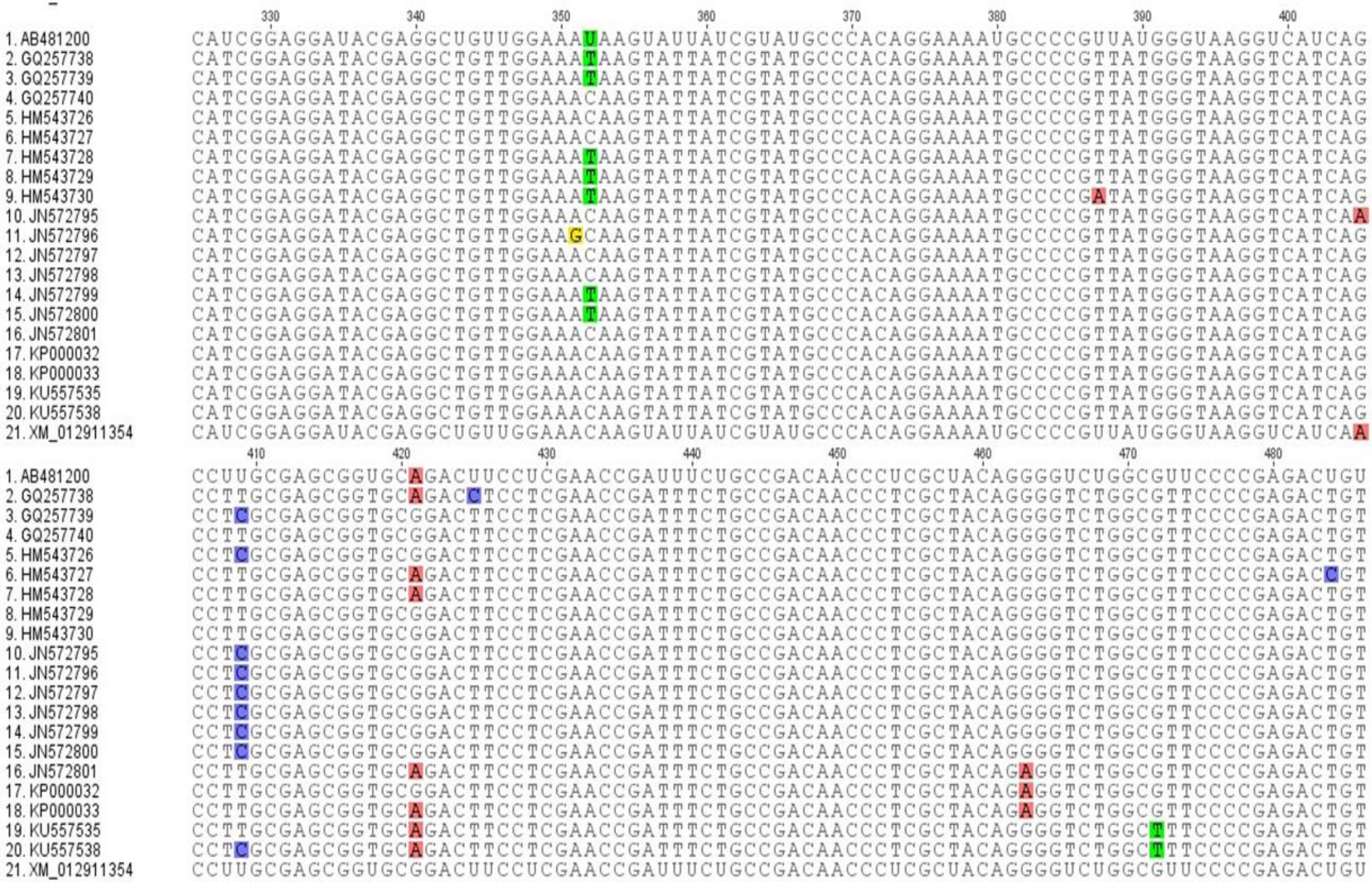
Tablo 4.3. Elde edilen izolatlar ile Dünyadan analizleri yapılan diğer izolatların BbigAMA-1 geni nükleotid dizilimlerinin ikili hizalama benzerlikleri

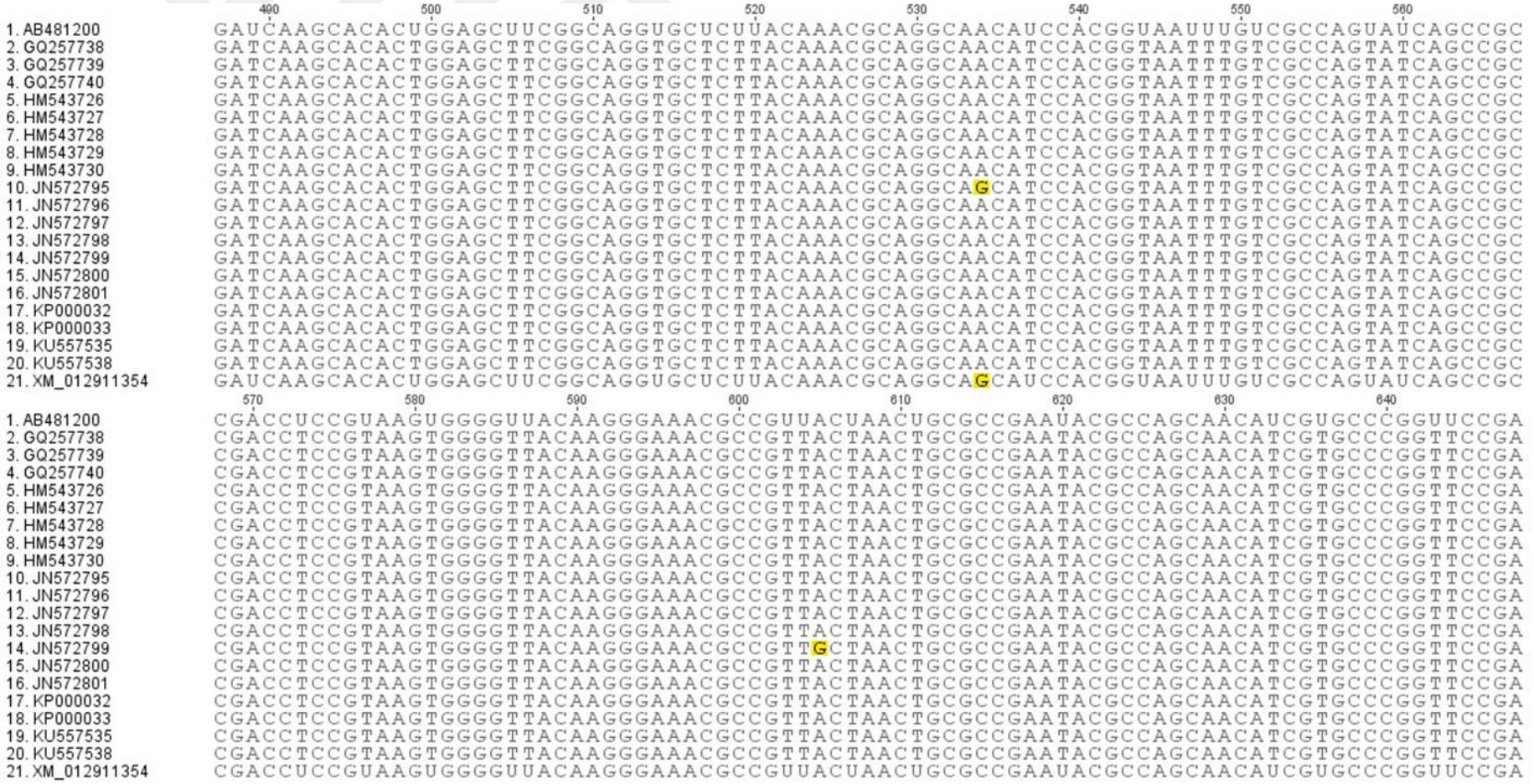
	AB481200	GQ257738	GQ257739	GQ257740	HM543726	HM543727	HM543728	HM543729	HM543730	JN572795	JN572796	JN572797	JN572798	JN572799	JN572800	JN572801	KP000032	KP000033	KJ557535	KJ557538	XM_01291...
AB481200		98.937%	98.937%	98.826%	98.937%	98.937%	99.105%	99.105%	98.993%	97.542%	98.156%	98.436%	98.045%	99.217%	98.937%	98.658%	98.714%	98.602%	98.993%	98.937%	98.210%
GQ257738	98.937%		99.105%	98.434%	98.770%	98.881%	98.937%	98.937%	99.049%	97.374%	97.765%	97.821%	97.877%	98.826%	98.993%	98.714%	98.770%	98.658%	98.825%	98.769%	97.931%
GQ257739	98.937%	99.105%		98.881%	98.993%	99.105%	98.937%	99.273%	99.049%	97.709%	98.101%	98.156%	98.324%	98.937%	99.217%	98.937%	99.105%	98.881%	98.937%	98.993%	98.154%
GQ257740	98.826%	98.434%	98.881%		98.993%	99.105%	99.049%	99.273%	98.937%	97.374%	97.765%	97.821%	97.877%	98.490%	98.658%	99.497%	99.553%	99.441%	99.161%	99.105%	97.987%
HM543726	98.937%	98.770%	98.993%	98.993%		99.105%	99.049%	99.049%	99.049%	97.598%	97.989%	98.045%	98.101%	99.049%	99.105%	98.937%	98.993%	98.881%	98.937%	98.993%	98.154%
HM543727	98.937%	98.881%	99.105%	99.105%	99.105%		99.273%	99.497%	99.385%	97.486%	97.877%	97.933%	97.989%	98.826%	98.770%	99.161%	99.217%	99.105%	99.273%	99.217%	98.043%
HM543728	99.105%	98.937%	98.937%	99.049%	99.049%	99.273%		99.441%	99.441%	97.374%	97.877%	97.933%	97.877%	98.881%	98.826%	98.993%	99.049%	98.937%	99.217%	99.161%	97.763%
HM543729	99.105%	98.937%	99.273%	99.273%	99.049%	99.497%	99.441%		99.553%	97.654%	98.045%	98.101%	98.156%	98.881%	98.937%	99.217%	99.385%	99.161%	99.328%	99.273%	98.098%
HM543730	98.993%	99.049%	99.049%	98.937%	99.049%	99.385%	99.441%	99.553%		97.542%	98.045%	98.101%	98.045%	99.105%	99.049%	98.993%	99.161%	98.937%	99.105%	99.049%	97.987%
JN572795	97.542%	97.374%	97.709%	97.374%	97.598%	97.486%	97.374%	97.654%	97.542%		99.048%	99.104%	99.048%	97.654%	97.933%	97.542%	97.598%	97.486%	97.429%	97.596%	97.598%
JN572796	98.156%	97.765%	98.101%	97.765%	97.989%	97.877%	97.877%	98.045%	98.045%	99.048%		99.720%	99.440%	98.268%	98.324%	97.933%	97.989%	97.877%	97.820%	97.988%	97.151%
JN572797	98.436%	97.821%	98.156%	97.821%	98.045%	97.933%	97.933%	98.101%	98.101%	99.104%	99.720%		99.496%	98.324%	98.380%	97.989%	98.045%	97.933%	97.988%	98.155%	97.207%
JN572798	98.045%	97.877%	98.324%	97.877%	98.101%	97.989%	97.877%	98.156%	98.045%	99.048%	99.440%	99.496%		98.156%	98.659%	98.045%	98.101%	97.989%	97.932%	98.099%	97.263%
JN572799	99.217%	98.826%	98.937%	98.490%	99.049%	98.826%	98.881%	98.881%	99.105%	97.654%	98.268%	98.324%	98.156%		99.161%	98.546%	98.602%	98.490%	98.545%	98.601%	97.987%
JN572800	98.937%	98.993%	99.217%	98.658%	99.105%	98.770%	98.826%	98.937%	99.049%	97.933%	98.324%	98.380%	98.659%	99.161%		98.714%	98.770%	98.658%	98.713%	98.881%	98.266%
JN572801	98.658%	98.714%	98.937%	99.497%	98.937%	99.161%	98.993%	99.217%	98.993%	97.542%	97.933%	97.989%	98.045%	98.546%	98.714%		99.832%	99.944%	99.328%	99.273%	97.931%
KP000032	98.714%	98.770%	99.105%	99.553%	98.993%	99.217%	99.049%	99.385%	99.161%	97.598%	97.989%	98.045%	98.101%	98.602%	98.770%	99.832%		99.776%	99.384%	99.328%	98.043%
KP000033	98.602%	98.658%	98.881%	99.441%	98.881%	99.105%	98.937%	99.161%	98.937%	97.486%	97.877%	97.933%	97.989%	98.490%	98.658%	99.944%	99.776%		99.273%	99.217%	97.875%
KJ557535	98.993%	98.825%	98.937%	99.161%	98.937%	99.273%	99.217%	99.328%	99.105%	97.429%	97.820%	97.988%	97.932%	98.545%	98.713%	99.328%	99.384%	99.273%		99.720%	97.874%
KJ557538	98.937%	98.769%	98.993%	99.105%	98.993%	99.217%	99.161%	99.273%	99.049%	97.596%	97.988%	98.155%	98.099%	98.601%	98.881%	99.273%	99.328%	99.217%	99.720%		97.929%
XM_012911354	98.210%	97.931%	98.154%	97.987%	98.154%	98.043%	97.763%	98.098%	97.987%	97.598%	97.151%	97.207%	97.263%	97.987%	98.266%	97.931%	98.043%	97.875%	97.874%	97.929%	

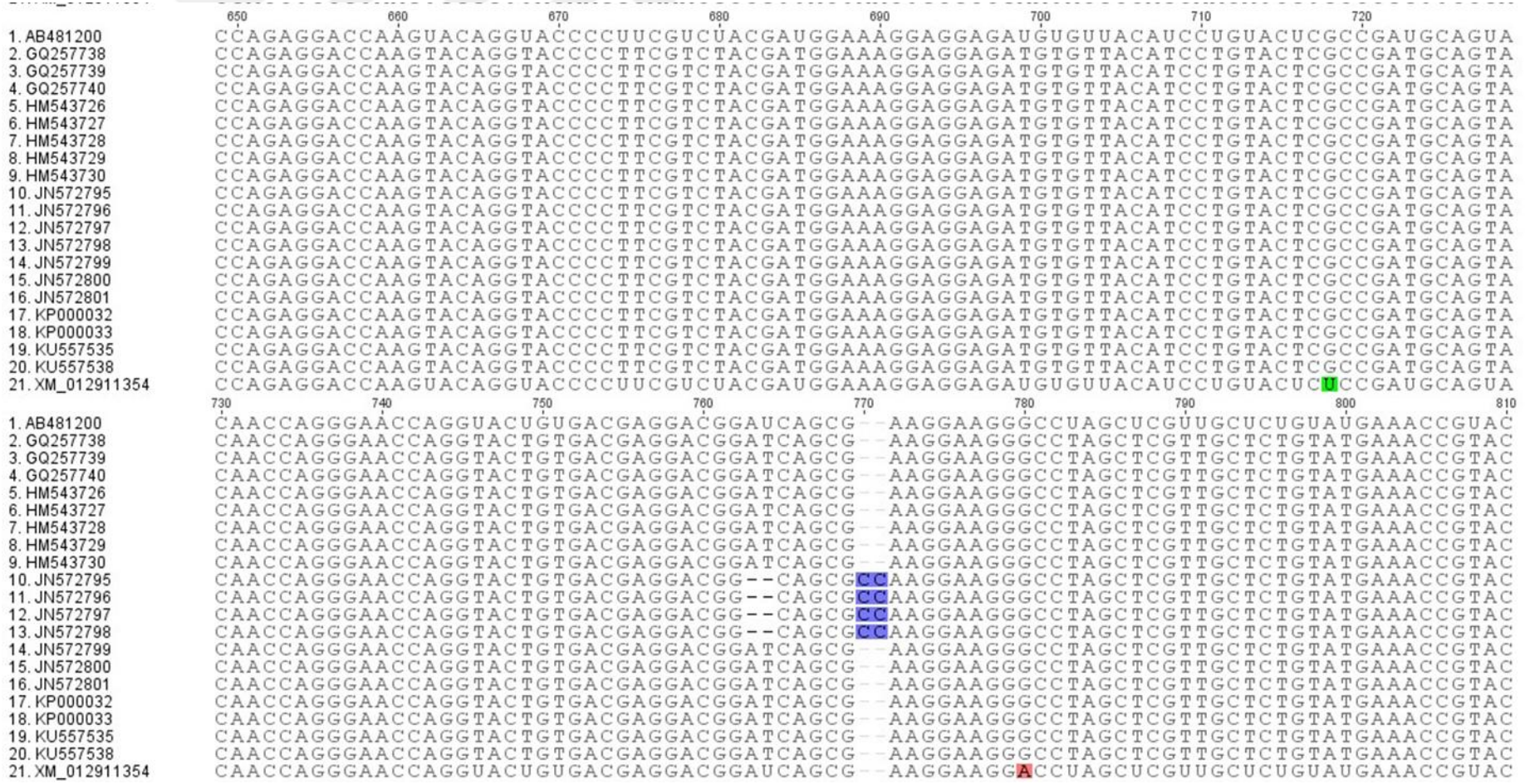
GenBank'a kayıtlı BbigAMA-1 geninin tamamının nükleotid dizilimlerini içeren izolatların, elde edilen izolatlar ile çoklu hizalamaları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

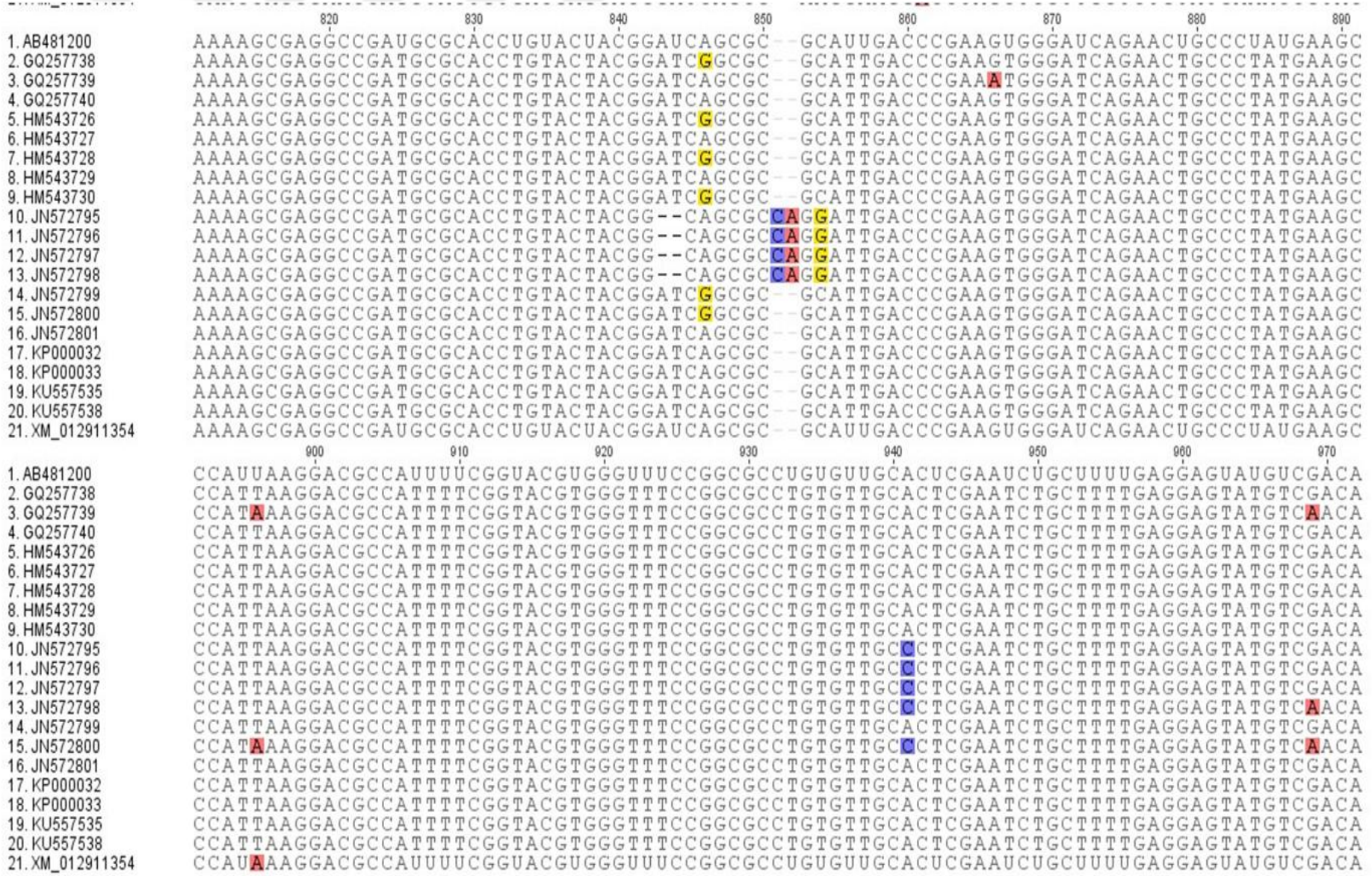


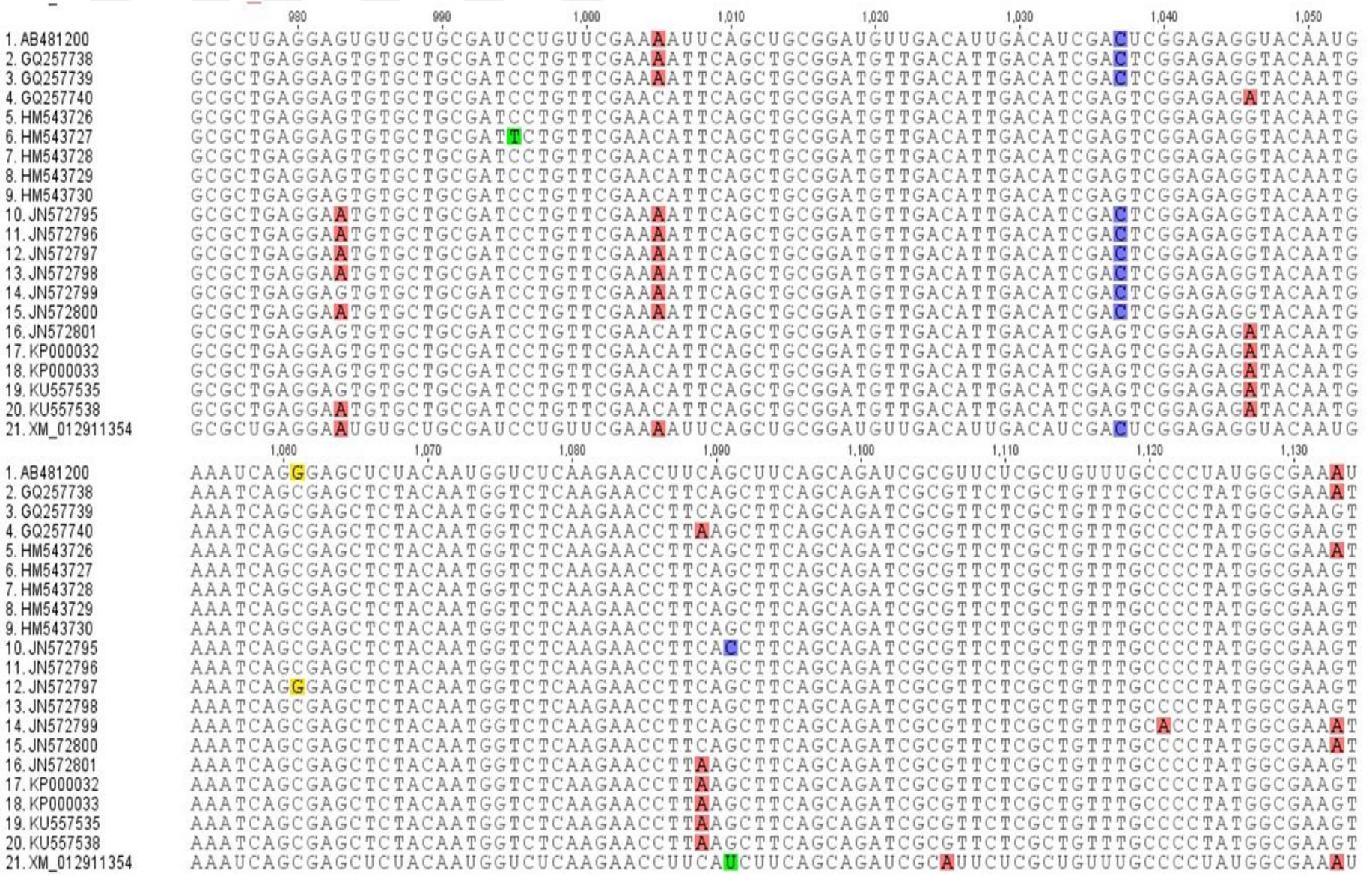

170 180 190 200 210 220 230 240
1. AB481200 UCAACAGGCGACUUCUAGUACUUCGCAAGCUGGAGCUGGCGAGGCUACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACUGCGGGCUCCAA
2. GQ257738 TCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGGAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCGCGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
3. GQ257739 TCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
4. GQ257740 TCAACAGGCGACCTCGAGTACCTCGCAAGCTGGAGCTGGGGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
5. HM543726 TCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
6. HM543727 TCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
7. HM543728 TCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
8. HM543729 TCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
9. HM543730 TCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
10. JN572795 CCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAGCCGCGGGCTCCAA
11. JN572796 CCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
12. JN572797 CCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
13. JN572798 TCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGCAGGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
14. JN572799 TCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
15. JN572800 TCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
16. JN572801 TCAACAGGCGACCTCGAGTACCTCGCAAGCTGGAGCTGGGGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
17. KP000032 TCAACAGGCGACCTCGAGTACCTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
18. KP000033 TCAACAGGCGACCTCGAGTACCTCGCAAGCTGGAGCTGGGGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
19. KU557535 TCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
20. KU557538 TCAACAGGCGACTTCTAGTACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCCAA
21. XM_012911354 UCAACAGGCGACUUCGAGUACUUCGCAAGCUGGAGCUGGUGAGGCUACAGAGCGCACGGGGGGGCAGAGCUGCGGGCUCCAA
250 260 270 280 290 300 310 320
1. AB481200 GCUUAUCCCGCAAACGCCAUGGACCAGGUACAUGAUCAAGUACGACAUCGCUCGCUGCCACGGAUCCGGUAUUUUCGUCGA
2. GQ257738 GCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGGTCCGGTATTTTCGTCGA
3. GQ257739 GCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
4. GQ257740 GCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
5. HM543726 GCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
6. HM543727 GCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
7. HM543728 GCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
8. HM543729 GCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
9. HM543730 GCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
10. JN572795 GCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
11. JN572796 GCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
12. JN572797 GCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
13. JN572798 GCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
14. JN572799 GCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
15. JN572800 GCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
16. JN572801 GCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
17. KP000032 GCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
18. KP000033 GCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
19. KU557535 GCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
20. KU557538 GCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGCCACGGATCCGGTATTTTCGTCGA
21. XM_012911354 GCUUAUCCCGCAAACGCCAUGGACCAGGUACAUGAUCAAGUACGACAUCGCUCGCUGCCACGGAUCCGGUAUUUUCGUCGA

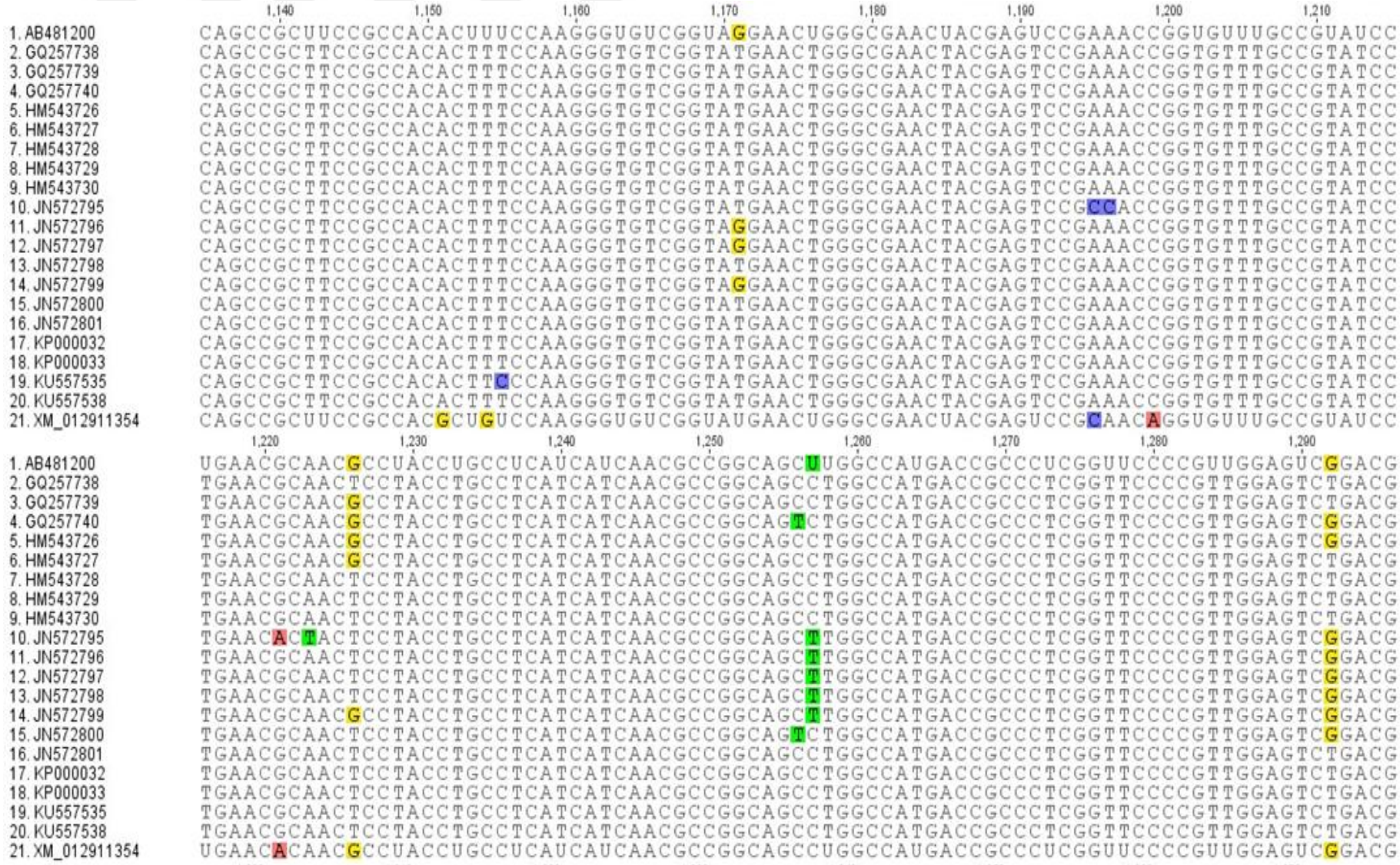

330 340 350 360 370 380 390 400
1. AB481200 CAUCGGAGGAUACGAGGCUGUUGGAAAUAAGUAUUAUCGUAUGCCCACAGGAAAAUGCCCCGUUAUGGGUAAGGUCAUCAG
2. GQ257738 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAATAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
3. GQ257739 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAATAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
4. GQ257740 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAACAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
5. HM543726 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAACAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
6. HM543727 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAACAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
7. HM543728 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAATAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
8. HM543729 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAATAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
9. HM543730 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAATAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGATATGGGTAAGGTCATCAG
10. JN572795 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAACAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAA
11. JN572796 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAGCAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
12. JN572797 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAACAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
13. JN572798 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAACAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
14. JN572799 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAATAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
15. JN572800 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAATAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
16. JN572801 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAACAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
17. KP000032 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAACAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
18. KP000033 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAACAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
19. KU557535 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAACAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
20. KU557538 CATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAACAAGTATTATCGTATGCCCACAGGAAAATGCCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAG
21. XM_012911354 CAUCGGAGGAUACGAGGCUGUUGGAAACAAGUAUUAUCGUAUGCCCACAGGAAAAUGCCCCGUUAUGGGUAAGGUCAUCAA
410 420 430 440 450 460 470 480
1. AB481200 CCUUGCGAGCGGUGCAGACUUCCUCGAACCGAUUUCUGCCGACAACCCUCGCUACAGGGGUCUGGCGUUCCCCGAGACUGU
2. GQ257738 CCTTGCGAGCGGTGCAGACCTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
3. GQ257739 CCTCGCGAGCGGTGCGGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
4. GQ257740 CCTTGCGAGCGGTGCGGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
5. HM543726 CCTCGCGAGCGGTGCGGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
6. HM543727 CCTTGCGAGCGGTGCAGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAGACCGT
7. HM543728 CCTTGCGAGCGGTGCAGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
8. HM543729 CCTTGCGAGCGGTGCGGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
9. HM543730 CCTTGCGAGCGGTGCGGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
10. JN572795 CCTCGCGAGCGGTGCGGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
11. JN572796 CCTCGCGAGCGGTGCGGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
12. JN572797 CCTCGCGAGCGGTGCGGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
13. JN572798 CCTCGCGAGCGGTGCGGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
14. JN572799 CCTCGCGAGCGGTGCGGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
15. JN572800 CCTCGCGAGCGGTGCGGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
16. JN572801 CCTTGCGAGCGGTGCAGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGAGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
17. KP000032 CCTTGCGAGCGGTGCGGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGAGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
18. KP000033 CCTTGCGAGCGGTGCAGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGAGGTCTGGCGTTCCCCGAGACTGT
19. KU557535 CCTTGCGAGCGGTGCAGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCTTTCCCCGAGACTGT
20. KU557538 CCTCGCGAGCGGTGCAGACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCTTTCCCCGAGACTGT
21. XM_012911354 CCUUGCGAGCGGUGCGGACUUCCUCGAACCGAUUUCUGCCGACAACCCUCGCUACAGGGGUCUGGCGUUCCCCGAGACUGU

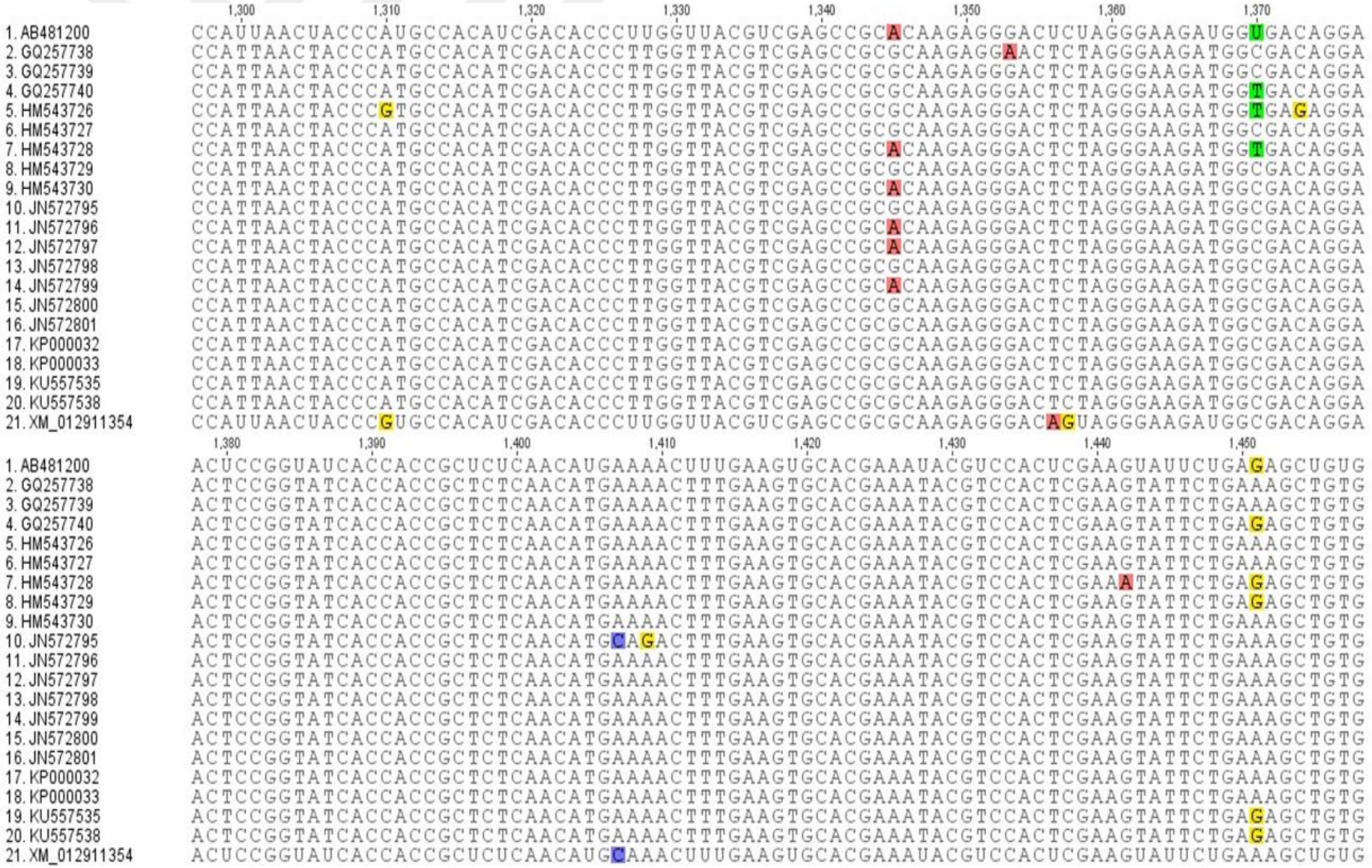

490 500 510 520 530 540 550 560
1. AB481200 GAUCAAGCACACUGGAGCUUCGGCAGGUGCUCUUACAAACGCAGGCAACAUCCACGGUAAUUUGUCGCCAGUAUCAGCCGC
2. GQ257738 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
3. GQ257739 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
4. GQ257740 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
5. HM543726 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
6. HM543727 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
7. HM543728 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
8. HM543729 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
9. HM543730 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
10. JN572795 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAGCATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
11. JN572796 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
12. JN572797 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
13. JN572798 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
14. JN572799 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
15. JN572800 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
16. JN572801 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
17. KP000032 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
18. KP000033 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
19. KU557535 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
20. KU557538 GATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAGCCGC
21. XM_012911354 GAUCAAGCACACUGGAGCUUCGGCAGGUGCUCUUACAAACGCAGGCAGCAUCCACGGUAAUUUGUCGCCAGUAUCAGCCGC
570 580 590 600 610 620 630 640
1. AB481200 CGACCUCCGUAAGUGGGGUUACAAGGGAAACGCCGUUACUAACUGCGCCGAAUACGCCAGCAACAUCGUGCCCGGUUCCGA
2. GQ257738 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
3. GQ257739 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
4. GQ257740 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
5. HM543726 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
6. HM543727 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
7. HM543728 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
8. HM543729 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
9. HM543730 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
10. JN572795 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
11. JN572796 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
12. JN572797 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
13. JN572798 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
14. JN572799 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTGCTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
15. JN572800 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
16. JN572801 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
17. KP000032 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
18. KP000033 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
19. KU557535 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
20. KU557538 CGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGA
21. XM_012911354 CGACCUCCGUAAGUGGGGUUACAAGGGAAACGCCGUUACUAACUGCGCCGAAUACGCCAGCAACAUCGUGCCCGGUUCCGA

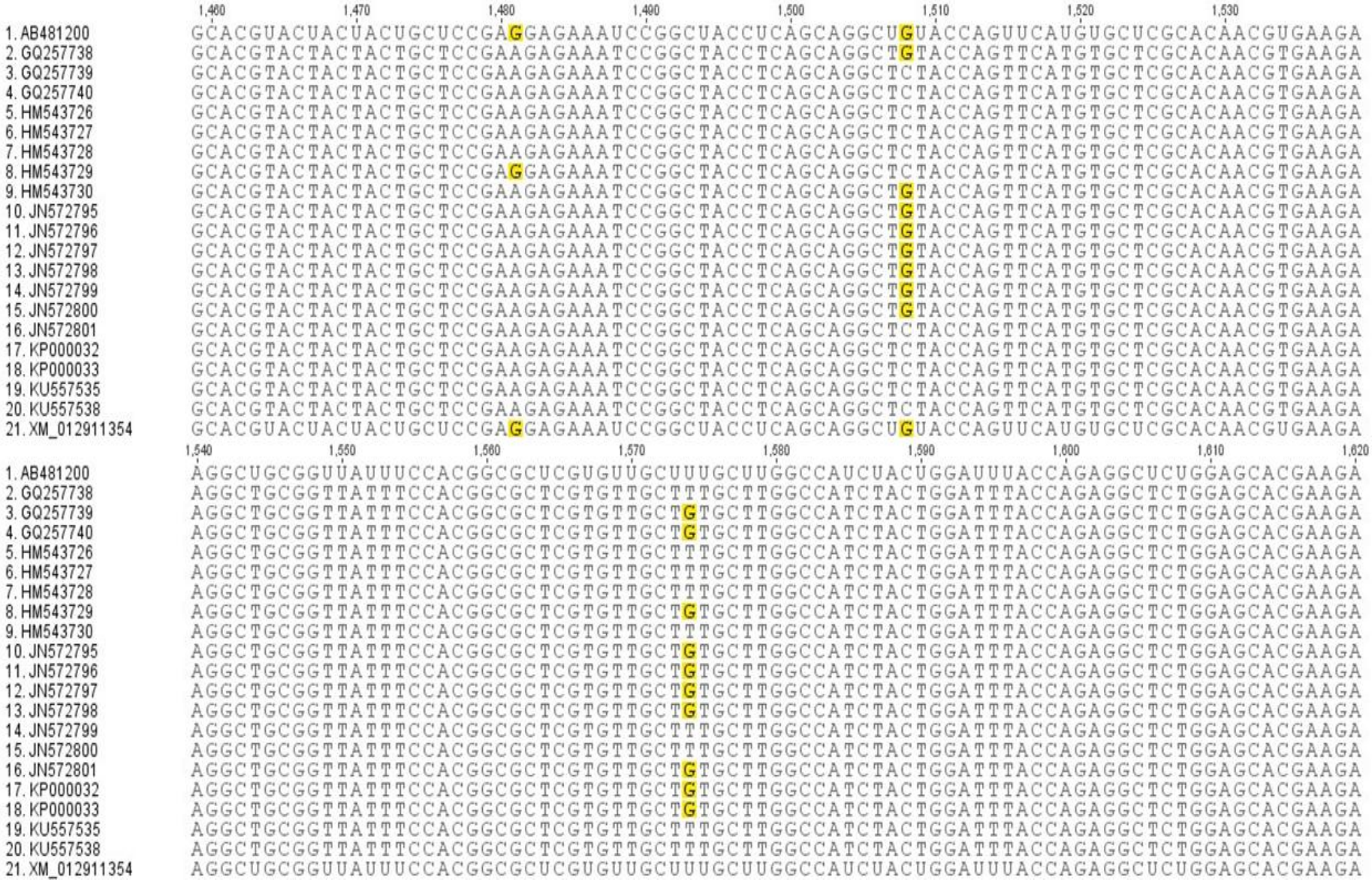

650 660 670 680 690 700 710 720
1. AB481200 CCAGAGGACCAAGUACAGGUACCCCUUCGUCUACGAUGGAAAGGAGGAGAUGUGUUACAUCCUGUACUCGCCGAUGCAGUA
2. GQ257738 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
3. GQ257739 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
4. GQ257740 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
5. HM543726 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
6. HM543727 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
7. HM543728 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
8. HM543729 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
9. HM543730 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
10. JN572795 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
11. JN572796 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
12. JN572797 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
13. JN572798 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
14. JN572799 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
15. JN572800 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
16. JN572801 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
17. KP000032 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
18. KP000033 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
19. KU557535 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
20. KU557538 CCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTA
21. XM_012911354 CCAGAGGACCAAGUACAGGUACCCCUUCGUCUACGAUGGAAAGGAGGAGAUGUGUUACAUCCUGUACUCUCCGAUGCAGUA
730 740 750 760 770 780 790 800 810
1. AB481200 CAACCAGGGAACCAGGUACUGUGACGAGGACGGAUCAGCG--AAGGAAGGGCCUAGCUCGUUGCUCUGUAUGAAACCGUAC
2. GQ257738 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
3. GQ257739 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
4. GQ257740 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
5. HM543726 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
6. HM543727 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
7. HM543728 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
8. HM543729 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
9. HM543730 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
10. JN572795 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGG--CAGCGCCAAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
11. JN572796 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGG--CAGCGCCAAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
12. JN572797 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGG--CAGCGCCAAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
13. JN572798 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGG--CAGCGCCAAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
14. JN572799 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
15. JN572800 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
16. JN572801 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
17. KP000032 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
18. KP000033 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
19. KU557535 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
20. KU557538 CAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCG--AAGGAAGGGCCTAGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTAC
21. XM_012911354 CAACCAGGGAACCAGGUACUGUGACGAGGACGGAUCAGCG--AAGGAAGGACCUAGCUCGUUGCUCUGUAUGAAACCGUAC

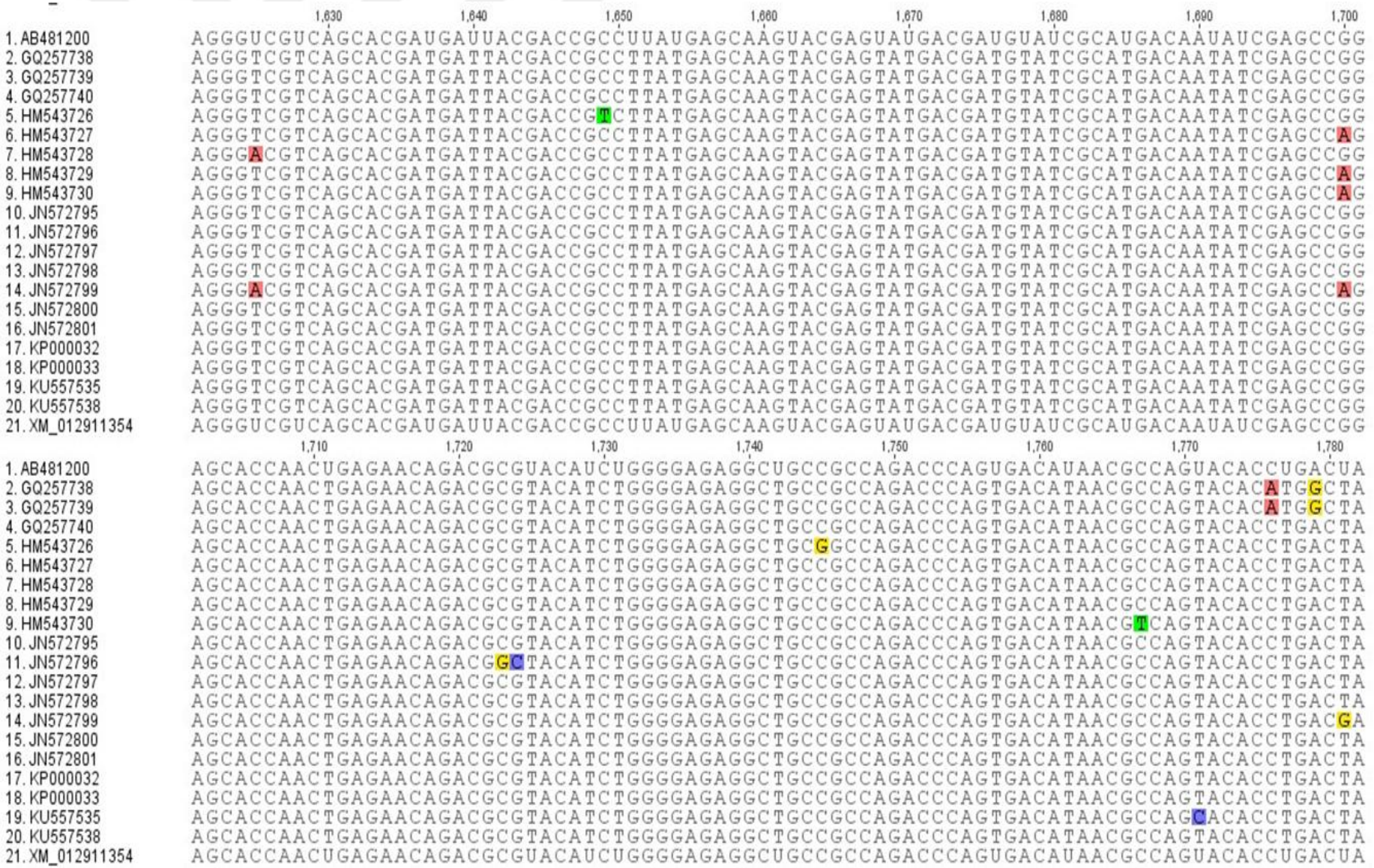

820 830 840 850 860 870 880 890
1. AB481200 AAAAGCGAGGCCGAUGCGCACCUGUACUACGGAUCAGCGC--GCAUUGACCCGAAGUGGGAUCAGAACUGCCCUAUGAAGC
2. GQ257738 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCGGCGC--GCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
3. GQ257739 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCAGCGC--GCATTGACCCGAAATGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
4. GQ257740 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCAGCGC--GCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
5. HM543726 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCGGCGC--GCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
6. HM543727 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCAGCGC--GCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
7. HM543728 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCGGCGC--GCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
8. HM543729 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCAGCGC--GCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
9. HM543730 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCGGCGC--GCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
10. JN572795 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGG--CAGCGCCAGGATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
11. JN572796 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGG--CAGCGCCAGGATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
12. JN572797 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGG--CAGCGCCAGGATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
13. JN572798 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGG--CAGCGCCAGGATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
14. JN572799 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCGGCGC--GCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
15. JN572800 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCGGCGC--GCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
16. JN572801 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCAGCGC--GCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
17. KP000032 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCAGCGC--GCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
18. KP000033 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCAGCGC--GCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
19. KU557535 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCAGCGC--GCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
20. KU557538 AAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGATCAGCGC--GCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAACTGCCCTATGAAGC
21. XM_012911354 AAAAGCGAGGCCGAUGCGCACCUGUACUACGGAUCAGCGC--GCAUUGACCCGAAGUGGGAUCAGAACUGCCCUAUGAAGC
900 910 920 930 940 950 960 970
1. AB481200 CCAUUAAGGACGCCAUUUUCGGUACGUGGGUUUCCGGCGCCUGUGUUGCACUCGAAUCUGCUUUUGAGGAGUAUGUCGACA
2. GQ257738 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
3. GQ257739 CCATAAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCAACA
4. GQ257740 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
5. HM543726 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
6. HM543727 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
7. HM543728 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
8. HM543729 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
9. HM543730 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
10. JN572795 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCCCTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
11. JN572796 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCCCTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
12. JN572797 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCCCTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
13. JN572798 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCCCTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCAACA
14. JN572799 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
15. JN572800 CCATAAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCCCTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCAACA
16. JN572801 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
17. KP000032 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
18. KP000033 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
19. KU557535 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
20. KU557538 CCATTAAGGACGCCATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTATGTCGACA
21. XM_012911354 CCAUAAAGGACGCCAUUUUCGGUACGUGGGUUUCCGGCGCCUGUGUUGCACUCGAAUCUGCUUUUGAGGAGUAUGUCGACA

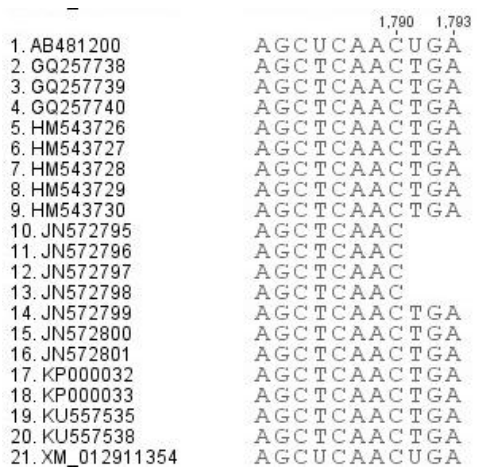

980 990 1,000 1,010 1,020 1,030 1,040 1,050
1. AB481200 GCGCUGAGGAGUGUGCUGCGAUCCUGUUCGAAAAUUCAGCUGCGGAUGUUGACAUUGACAUCGACUCGGAGAGGUACAAUG
2. GQ257738 GCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATG
3. GQ257739 GCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATG
4. GQ257740 GCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTCGAACATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGAGTCGGAGAGATACAATG
5. HM543726 GCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTCGAACATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGAGTCGGAGAGGTACAATG
6. HM543727 GCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATTCTGTTCGAACATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGAGTCGGAGAGGTACAATG
7. HM543728 GCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTCGAACATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGAGTCGGAGAGGTACAATG
8. HM543729 GCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTCGAACATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGAGTCGGAGAGGTACAATG
9. HM543730 GCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTCGAACATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGAGTCGGAGAGGTACAATG
10. JN572795 GCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATG
11. JN572796 GCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATG
12. JN572797 GCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATG
13. JN572798 GCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATG
14. JN572799 GCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATG
15. JN572800 GCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATG
16. JN572801 GCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTCGAACATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGAGTCGGAGAGATACAATG
17. KP000032 GCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTCGAACATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGAGTCGGAGAGATACAATG
18. KP000033 GCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTCGAACATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGAGTCGGAGAGATACAATG
19. KU557535 GCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTCGAACATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGAGTCGGAGAGATACAATG
20. KU557538 GCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTCGAACATTCAGCTGCGGATGTTGACATTGACATCGAGTCGGAGAGATACAATG
21. XM_012911354 GCGCUGAGGAAUGUGCUGCGAUCCUGUUCGAAAAUUCAGCUGCGGAUGUUGACAUUGACAUCGACUCGGAGAGGUACAAUG
1,060 1,070 1,080 1,090 1,100 1,110 1,120 1,130
1. AB481200 AAAUCAGGGAGCUCUACAAUGGUCUCAAGAACCUUCAGCUUCAGCAGAUCGCGUUCUCGCUGUUUGCCCCUAUGGCGAAAU
2. GQ257738 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTCAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAAT
3. GQ257739 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTCAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
4. GQ257740 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTAAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
5. HM543726 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTCAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAAT
6. HM543727 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTCAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
7. HM543728 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTCAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
8. HM543729 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTCAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
9. HM543730 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTCAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
10. JN572795 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTCACCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
11. JN572796 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTCAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
12. JN572797 AAATCAGGGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTCAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
13. JN572798 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTCAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
14. JN572799 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTCAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCACCTATGGCGAAAT
15. JN572800 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTCAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAAT
16. JN572801 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTAAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
17. KP000032 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTAAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
18. KP000033 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTAAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
19. KU557535 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTAAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
20. KU557538 AAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAACCTTAAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGCCCCTATGGCGAAGT
21. XM_012911354 AAAUCAGCGAGCUCUACAAUGGUCUCAAGAACCUUCAUCUUCAGCAGAUCGCAUUCUCGCUGUUUGCCCCUAUGGCGAAAU


1,140 1,150 1,160 1,170 1,180 1,190 1,200 1,210
1. AB481200 CAGCCGCUUCCGCCACACUUUCCAAGGGUGUCGGUAGGAACUGGGCGAACUACGAGUCCGAAACCGGUGUUUGCCGUAUCC
2. GQ257738 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
3. GQ257739 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
4. GQ257740 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
5. HM543726 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
6. HM543727 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
7. HM543728 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
8. HM543729 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
9. HM543730 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
10. JN572795 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGCCACCGGTGTTTGCCGTATCC
11. JN572796 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTAGGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
12. JN572797 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTAGGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
13. JN572798 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
14. JN572799 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTAGGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
15. JN572800 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
16. JN572801 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
17. KP000032 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
18. KP000033 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
19. KU557535 CAGCCGCTTCCGCCACACTTCCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
20. KU557538 CAGCCGCTTCCGCCACACTTTCCAAGGGTGTCGGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTTTGCCGTATCC
21. XM_012911354 CAGCCGCUUCCGCCACGCUGUCCAAGGGUGUCGGUAUGAACUGGGCGAACUACGAGUCCGCAACAGGUGUUUGCCGUAUCC
1,220 1,230 1,240 1,250 1,260 1,270 1,280 1,290
1. AB481200 UGAACGCAACGCCUACCUGCCUCAUCAUCAACGCCGGCAGCUUGGCCAUGACCGCCCUCGGUUCCCCGUUGGAGUCGGACG
2. GQ257738 TGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCTGACG
3. GQ257739 TGAACGCAACGCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCTGACG
4. GQ257740 TGAACGCAACGCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGTCTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCGGACG
5. HM543726 TGAACGCAACGCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCGGACG
6. HM543727 TGAACGCAACGCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCTGACG
7. HM543728 TGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCTGACG
8. HM543729 TGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCTGACG
9. HM543730 TGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCTGACG
10. JN572795 TGAACACTACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCTTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCGGACG
11. JN572796 TGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCTTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCGGACG
12. JN572797 TGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCTTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCGGACG
13. JN572798 TGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCTTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCGGACG
14. JN572799 TGAACGCAACGCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCTTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCGGACG
15. JN572800 TGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGTCTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCGGACG
16. JN572801 TGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCTGACG
17. KP000032 TGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCTGACG
18. KP000033 TGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCTGACG
19. KU557535 TGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCTGACG
20. KU557538 TGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATGACCGCCCTCGGTTCCCCGTTGGAGTCTGACG
21. XM_012911354 UGAACACAACGCCUACCUGCCUCAUCAUCAACGCCGGCAGCCUGGCCAUGACCGCCCUCGGUUCCCCGUUGGAGUCGGACG


1,300 1,310 1,320 1,330 1,340 1,350 1,360 1,370
1. AB481200 CCAUUAACUACCCAUGCCACAUCGACACCCUUGGUUACGUCGAGCCGCACAAGAGGGACUCUAGGGAAGAUGGUGACAGGA
2. GQ257738 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGAACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
3. GQ257739 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
4. GQ257740 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGTGACAGGA
5. HM543726 CCATTAACTACCCGTGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGTGAGGAGA
6. HM543727 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
7. HM543728 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCACAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGTGACAGGA
8. HM543729 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
9. HM543730 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCACAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
10. JN572795 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
11. JN572796 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCACAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
12. JN572797 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCACAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
13. JN572798 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
14. JN572799 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCACAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
15. JN572800 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
16. JN572801 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
17. KP000032 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
18. KP000033 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
19. KU557535 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
20. KU557538 CCATTAACTACCCATGCCACATCGACACCCTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGA
21. XM_012911354 CCAUUAACUACCCGUGCCACAUCGACACCCUUGGUUACGUCGAGCCGCGCAAGAGGGACAGUAGGGAAGAUGGCGACAGGA
1,380 1,390 1,400 1,410 1,420 1,430 1,440 1,450
1. AB481200 ACUCCGGUAUCACCACCGCUCUCAACAUGAAAACUUUGAAGUGCACGAAAUACGUCCACUCGAAGUAUUCUGAGAGCUGUG
2. GQ257738 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAAAGCTGTG
3. GQ257739 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAAAGCTGTG
4. GQ257740 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAGAGCTGTG
5. HM543726 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAAAGCTGTG
6. HM543727 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAAAGCTGTG
7. HM543728 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAATATTCTGAGAGCTGTG
8. HM543729 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAGAGCTGTG
9. HM543730 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAAAGCTGTG
10. JN572795 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGCAGACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAAAGCTGTG
11. JN572796 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAAAGCTGTG
12. JN572797 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAAAGCTGTG
13. JN572798 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAAAGCTGTG
14. JN572799 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAAAGCTGTG
15. JN572800 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAAAGCTGTG
16. JN572801 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAAAGCTGTG
17. KP000032 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAAAGCTGTG
18. KP000033 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAAAGCTGTG
19. KU557535 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAGAGCTGTG
20. KU557538 ACTCCGGTATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTATTCTGAGAGCTGTG
21. XM_012911354 ACUCCGGUAUCACCACCGCUCUCAACAUGCAAACUUUGAAGUGCACGAAAUACGUCCACUCGAAGUAUUCUGAAAGCUGUG


1,460 1,470 1,480 1,490 1,500 1,510 1,520 1,530
1. AB481200 GCACGUACUACUACUGCUCCGAGGAGAAAUCCGGCUACCUCAGCAGGCUGUACCAGUUCAUGUGCUCGCACAACGUGAAGA
2. GQ257738 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
3. GQ257739 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
4. GQ257740 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
5. HM543726 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
6. HM543727 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
7. HM543728 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
8. HM543729 GCACGTACTACTACTGCTCCGAGGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
9. HM543730 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
10. JN572795 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
11. JN572796 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
12. JN572797 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
13. JN572798 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
14. JN572799 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
15. JN572800 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
16. JN572801 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
17. KP000032 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
18. KP000033 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
19. KU557535 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
20. KU557538 GCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGGCTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGA
21. XM_012911354 GCACGUACUACUACUGCUCCGAGGAGAAAUCCGGCUACCUCAGCAGGCUGUACCAGUUCAUGUGCUCGCACAACGUGAAGA
1,540 1,550 1,560 1,570 1,580 1,590 1,600 1,610 1,620
1. AB481200 AGGCUGCGGUUAUUUCCACGGCGCUCGUGUUGCUUUGCUUGGCCAUCUACUGGAUUUACCAGAGGCUCUGGAGCACGAAGA
2. GQ257738 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTTTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
3. GQ257739 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
4. GQ257740 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
5. HM543726 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTTTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
6. HM543727 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTTTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
7. HM543728 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTTTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
8. HM543729 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
9. HM543730 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTTTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
10. JN572795 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
11. JN572796 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
12. JN572797 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
13. JN572798 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
14. JN572799 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTTTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
15. JN572800 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTTTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
16. JN572801 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
17. KP000032 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
18. KP000033 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
19. KU557535 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTTTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
20. KU557538 AGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTCGTGTTGCTTTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGA
21. XM_012911354 AGGCUGCGGUUAUUUCCACGGCGCUCGUGUUGCUUUGCUUGGCCAUCUACUGGAUUUACCAGAGGCUCUGGAGCACGAAGA


1,630 1,640 1,650 1,660 1,670 1,680 1,690 1,700
1. AB481200 AGGGUCGUCAGCACGAUGAUUACGACCGCCUUAUGAGCAAGUACGAGUAUGACGAUGUAUCGCAUGACAAUAUCGAGCCGG
2. GQ257738 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
3. GQ257739 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
4. GQ257740 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
5. HM543726 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGTCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
6. HM543727 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCAG
7. HM543728 AGGGACGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
8. HM543729 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCAG
9. HM543730 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCAG
10. JN572795 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
11. JN572796 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
12. JN572797 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
13. JN572798 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
14. JN572799 AGGGACGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCAG
15. JN572800 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
16. JN572801 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
17. KP000032 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
18. KP000033 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
19. KU557535 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
20. KU557538 AGGGTCGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCATGACAATATCGAGCCGG
21. XM_012911354 AGGGUCGUCAGCACGAUGAUUACGACCGCCUUAUGAGCAAGUACGAGUAUGACGAUGUAUCGCAUGACAAUAUCGAGCCGG
1,710 1,720 1,730 1,740 1,750 1,760 1,770 1,780
1. AB481200 AGCACCAACUGAGAACAGACGCGUACAUCUGGGGAGAGGCUGCCGCCAGACCCAGUGACAUAACGCCAGUACACCUGACUA
2. GQ257738 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACATGGCTA
3. GQ257739 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACATGGCTA
4. GQ257740 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTA
5. HM543726 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCGGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTA
6. HM543727 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTA
7. HM543728 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTA
8. HM543729 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTA
9. HM543730 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGTCAGTACACCTGACTA
10. JN572795 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTA
11. JN572796 AGCACCAACTGAGAACAGACGGCTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTA
12. JN572797 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTA
13. JN572798 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTA
14. JN572799 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACGA
15. JN572800 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTA
16. JN572801 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTA
17. KP000032 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTA
18. KP000033 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTA
19. KU557535 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGCACACCTGACTA
20. KU557538 AGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCCGCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTA
21. XM_012911354 AGCACCAACUGAGAACAGACGCGUACAUCUGGGGAGAGGCUGCCGCCAGACCCAGUGACAUAACGCCAGUACACCUGACUA



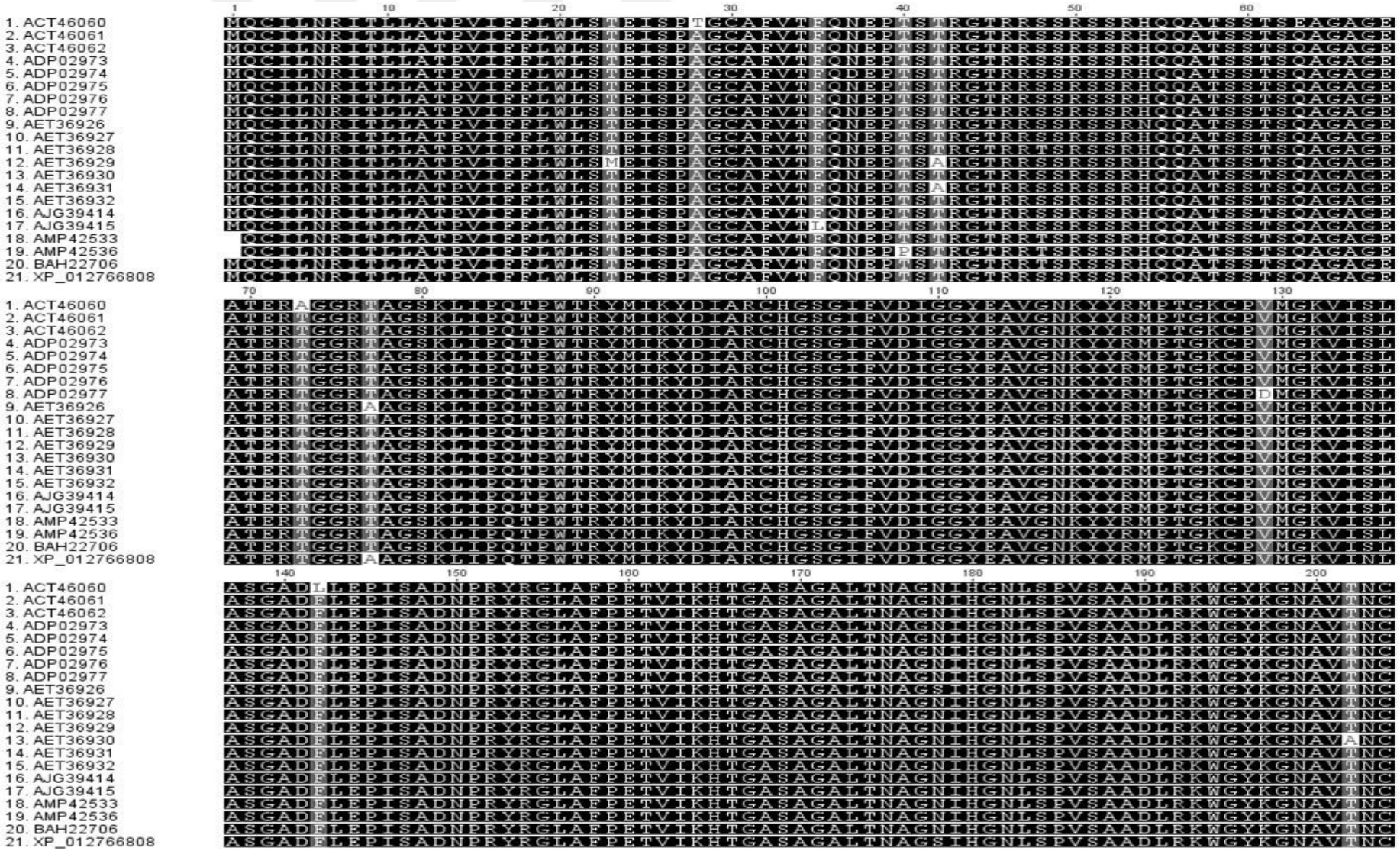
Şekil 4.9. Elde edilen izolatlar ile GenBank'a kaydedilmiş diğer izolatların çoklu hizalama analizleri sonucu oluşan nükleotid farklılıkları (renkli)

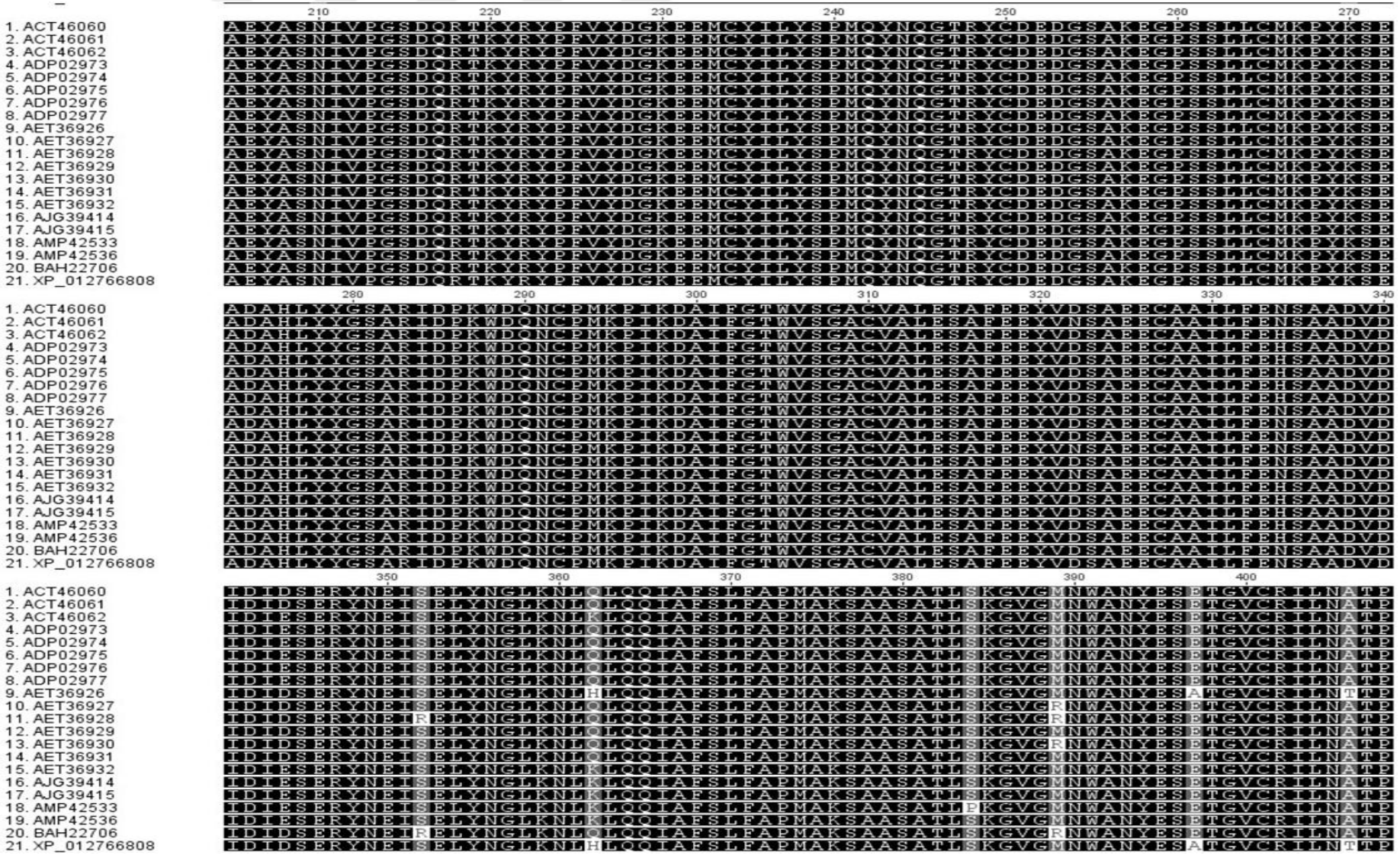
BbigAMA-1 geni nükleotid dizilimlerinin çoklu ve ikili hizalama analizleri sonucunda çalışmamızdan elde edilen Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2 izolatlarının Dünya'dan GenBank kaydı yapılmış diğer izolatlar ile %97,4-%99,9 oranlarında identiklik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2 izolatlarının kendi aralarında %99,776 oranında identik olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında, Kayseri/Turkey IV1 izolatı en yüksek identikliği %99,832'lik oranla Meksika'dan kaydı yapılmış JN572801 GenBank aksesyon numarasına sahip "Turkey" izolatı ile göstermiştir. Yine çalışmamızdan elde edilen Kayseri/Turkey IT2 izolatının söz konusu "Turkey" izolatı ile %99,944 oranında identik olduğu da belirlenmiştir. Öte yandan, çoklu hizalama analizleri sonucunda izolatların nükleotid dizilerinin intron içermediği de tespit edilmiştir.

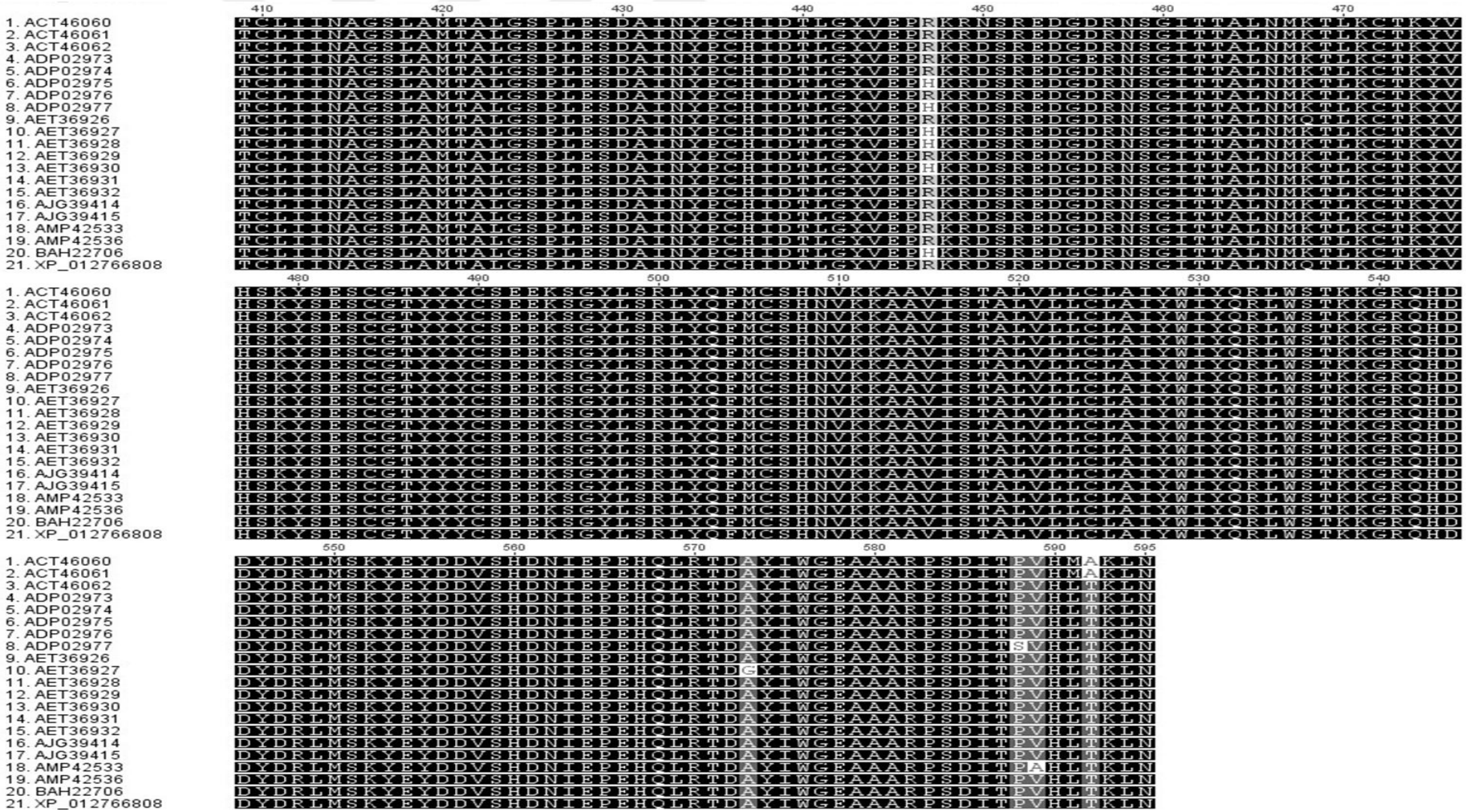
Dünyanın çeşitli ülkelerinden çoklu hizalama analizlerine dahil edilen ve çalışmamızdan elde edilen izolatların BbigAMA-1 geni amino asit dizilimlerinin (Kayseri/Turkey IV1: AJG39414; Kayseri/Turkey IT2: AJG39415) ikili hizalama benzerlikleri (pairwise distance) Tablo 4.4'de verilmiştir. GenBank'a kayıtlı BbigAMA-1 genini kodlayan amino asit dizilimlerini içeren izolatların, elde edilen izolatlar ile çoklu hizalamaları ve kıyaslamaları ise Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Elde edilen izolatlar ile Dünyadan analizleri yapılan diğer izolatların BbigAMA-1 geni amino asit dizilimlerinin ikili hizalama benzerlikleri

	ACT46060	ACT46061	ACT46062	ADP02973	ADP02974	ADP02975	ADP02976	ADP02977	AET36926	AET36927	AET36928	AET36929	AET36930	AET36931	AET36932	AJG39414	AJG39415	AMP42533	AMP42536	BAH22706	XP_01276...
ACT46060		98.992%	98.319%	98.319%	98.319%	98.319%	98.487%	97.983%	97.479%	98.151%	98.151%	98.319%	98.319%	98.487%	98.319%	98.319%	98.151%	97.811%	97.980%	98.151%	97.479%
ACT46061	98.992%		98.992%	98.992%	98.992%	98.992%	99.160%	98.655%	98.151%	98.824%	98.824%	99.328%	98.992%	99.496%	98.992%	98.992%	98.824%	98.485%	98.653%	98.824%	98.151%
ACT46062	98.319%	98.992%		99.664%	99.664%	99.664%	99.832%	99.328%	98.319%	98.824%	98.824%	98.992%	98.992%	99.160%	100%	100%	99.832%	99.495%	99.663%	98.824%	98.319%
ADP02973	98.319%	98.992%	99.664%		99.664%	99.664%	99.832%	99.328%	98.151%	98.824%	98.824%	98.992%	98.992%	99.160%	99.664%	99.664%	99.496%	99.158%	99.327%	98.824%	98.151%
ADP02974	98.319%	98.992%	99.664%	99.664%		99.664%	99.832%	99.328%	98.151%	98.824%	98.824%	98.992%	98.992%	99.160%	99.664%	99.664%	99.496%	99.158%	99.327%	98.824%	98.151%
ADP02975	98.319%	98.992%	99.664%	99.664%	99.664%		99.832%	99.664%	98.151%	99.160%	99.160%	98.992%	99.328%	99.160%	99.664%	99.664%	99.496%	99.158%	99.327%	99.160%	98.151%
ADP02976	98.487%	99.160%	99.832%	99.832%	99.832%	99.832%		99.496%	98.319%	98.992%	98.992%	99.160%	99.160%	99.328%	99.832%	99.832%	99.664%	99.327%	99.495%	98.992%	98.319%
ADP02977	97.983%	98.655%	99.328%	99.328%	99.328%	99.664%	99.496%		97.815%	98.824%	98.824%	98.655%	98.992%	98.824%	99.328%	99.328%	99.160%	98.822%	98.990%	98.824%	97.815%
AET36926	97.479%	98.151%	98.319%	98.151%	98.151%	98.151%	98.319%	97.815%		97.983%	97.983%	98.151%	98.151%	98.319%	98.319%	98.319%	98.151%	97.811%	97.980%	97.983%	100%
AET36927	98.151%	98.824%	98.824%	98.824%	98.824%	99.160%	98.992%	98.824%	97.983%		99.328%	98.824%	99.496%	98.992%	98.824%	98.824%	98.655%	98.316%	98.485%	99.328%	97.983%
AET36928	98.151%	98.824%	98.824%	98.824%	98.824%	99.160%	98.992%	98.824%	97.983%	99.328%		98.824%	99.496%	98.992%	98.824%	98.824%	98.655%	98.653%	98.822%	100%	97.983%
AET36929	98.319%	99.328%	98.992%	98.992%	98.992%	98.992%	99.160%	98.655%	98.151%	98.824%	98.824%		98.992%	99.832%	98.992%	98.992%	98.824%	98.485%	98.653%	98.824%	98.151%
AET36930	98.319%	98.992%	98.992%	98.992%	98.992%	99.328%	99.160%	98.992%	98.151%	99.496%	99.496%	98.992%		99.160%	98.992%	98.992%	98.824%	98.485%	98.653%	99.496%	98.151%
AET36931	98.487%	99.496%	99.160%	99.160%	99.160%	99.160%	99.328%	98.824%	98.319%	98.992%	98.992%	99.832%	99.160%		99.160%	99.160%	98.992%	98.653%	98.822%	98.992%	98.319%
AET36932	98.319%	98.992%	100%	99.664%	99.664%	99.664%	99.832%	99.328%	98.319%	98.824%	98.824%	98.992%	98.992%	99.160%		100%	99.832%	99.495%	99.663%	98.824%	98.319%
AJG39414	98.319%	98.992%	100%	99.664%	99.664%	99.664%	99.832%	99.328%	98.319%	98.824%	98.824%	98.992%	98.992%	99.160%	100%		99.832%	99.495%	99.663%	98.824%	98.319%
AJG39415	98.151%	98.824%	99.832%	99.496%	99.496%	99.496%	99.664%	99.160%	98.151%	98.655%	98.655%	98.824%	98.824%	98.992%	99.832%	99.832%		99.327%	99.495%	98.655%	98.151%
AMP42533	97.811%	98.485%	99.495%	99.158%	99.158%	99.158%	99.327%	98.822%	97.811%	98.316%	98.653%	98.485%	98.485%	98.653%	99.495%	99.495%	99.327%		99.495%	98.653%	97.811%
AMP42536	97.980%	98.653%	99.663%	99.327%	99.327%	99.327%	99.495%	98.990%	97.980%	98.485%	98.822%	98.653%	98.653%	98.822%	99.663%	99.663%	99.495%	99.495%		98.822%	97.980%
BAH22706	98.151%	98.824%	98.824%	98.824%	98.824%	99.160%	98.992%	98.824%	97.983%	99.328%	100%	98.824%	99.496%	98.992%	98.824%	98.824%	98.655%	98.653%	98.822%		97.983%
XP_012766808	97.479%	98.151%	98.319%	98.151%	98.151%	98.151%	98.319%	97.815%	100%	97.983%	97.983%	98.151%	98.151%	98.319%	98.319%	98.319%	98.151%	97.811%	97.980%	97.983%	


1. ACT46060
2. ACT46061
3. ACT46062
4. ADP02973
5. ADP02974
6. ADP02975
7. ADP02976
8. ADP02977
9. AET36926
10. AET36927
11. AET36928
12. AET36929
13. AET36930
14. AET36931
15. AET36932
16. AJG39414
17. AJG39415
18. AMP42533
19. AMP42536
20. BAH22706
21. XP_012766808

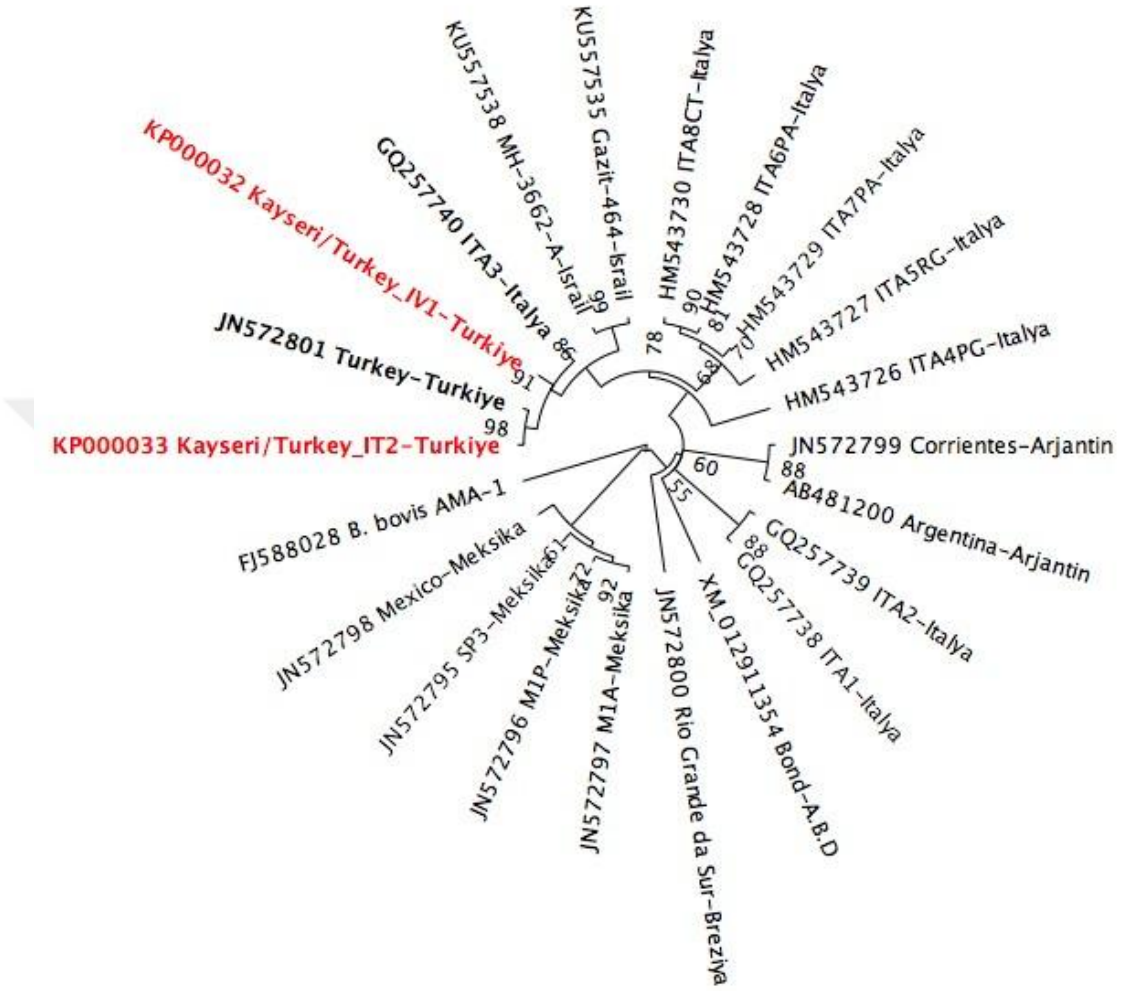

210 220 230 240 250 260 270
1. ACT46060 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
2. ACT46061 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
3. ACT46062 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
4. ADP02973 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
5. ADP02974 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
6. ADP02975 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
7. ADP02976 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
8. ADP02977 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
9. AET36926 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
10. AET36927 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
11. AET36928 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
12. AET36929 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
13. AET36930 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
14. AET36931 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
15. AET36932 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
16. AJG39414 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
17. AJG39415 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
18. AMP42533 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
19. AMP42536 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
20. BAH22706 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
21. XP_012766808 AEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSE
280 290 300 310 320 330 340
1. ACT46060 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFENSAADVD
2. ACT46061 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVNSAEECAAILFENSAADVD
3. ACT46062 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVD
4. ADP02973 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVD
5. ADP02974 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVD
6. ADP02975 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVD
7. ADP02976 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVD
8. ADP02977 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVD
9. AET36926 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFENSAADVD
10. AET36927 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFENSAADVD
11. AET36928 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFENSAADVD
12. AET36929 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVNSAEECAAILFENSAADVD
13. AET36930 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFENSAADVD
14. AET36931 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVNSAEECAAILFENSAADVD
15. AET36932 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVD
16. AJG39414 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFENSAADVD
17. AJG39415 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVD
18. AMP42533 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFENSAADVD
19. AMP42536 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVD
20. BAH22706 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFENSAADVD
21. XP_012766808 ADAHLYYGSARIDPKWDQNCPMKPIKDAIFGTWVSGACVALESAFEEYVDSAEECAAILFENSAADVD
350 360 370 380 390 400
1. ACT46060 IDIDSERYNEISELYNGLKNLQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
2. ACT46061 IDIDSERYNEISELYNGLKNLQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
3. ACT46062 IDIESERYNEISELYNGLKNLKLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
4. ADP02973 IDIESERYNEISELYNGLKNLQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
5. ADP02974 IDIESERYNEISELYNGLKNLQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
6. ADP02975 IDIESERYNEISELYNGLKNLQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
7. ADP02976 IDIESERYNEISELYNGLKNLQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
8. ADP02977 IDIESERYNEISELYNGLKNLQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
9. AET36926 IDIDSERYNEISELYNGLKNLHLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESATGVCRILNTTP
10. AET36927 IDIDSERYNEISELYNGLKNLQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGRNWANYESPTGVCRILNATP
11. AET36928 IDIESERYNEIRELYNGLKNLQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGRNWANYESPTGVCRILNATP
12. AET36929 IDIDSERYNEISELYNGLKNLQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
13. AET36930 IDIDSERYNEISELYNGLKNLQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGRNWANYESPTGVCRILNATP
14. AET36931 IDIDSERYNEISELYNGLKNLQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
15. AET36932 IDIESERYNEISELYNGLKNLKLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
16. AJG39414 IDIESERYNEISELYNGLKNLKLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
17. AJG39415 IDIESERYNEISELYNGLKNLKLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
18. AMP42533 IDIESERYNEISELYNGLKNLKLQQIAFSLFAPMAKSAASATLPKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
19. AMP42536 IDIDSERYNEISELYNGLKNLQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESPTGVCRILNATP
20. BAH22706 IDIDSERYNEIRELYNGLKNLQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGRNWANYESPTGVCRILNATP
21. XP_012766808 IDIDSERYNEISELYNGLKNLHLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESATGVCRILNTTP



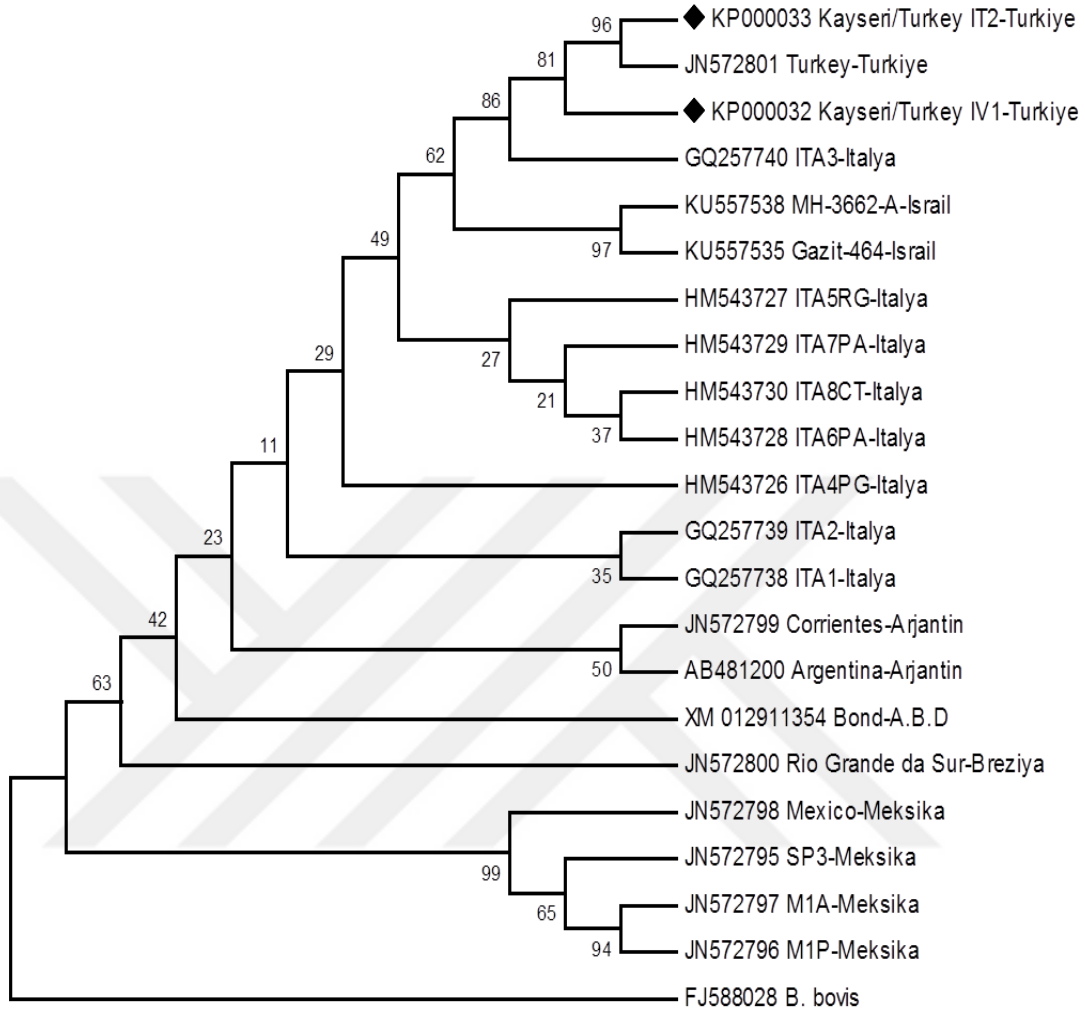
Şekil 4.10. Elde edilen izolatlar ile GenBank'a kaydedilmiş diğer izolatların çoklu hizalama analizleri sonucu oluşan amino asit farklılıkları (beyaz renkli)

BbigAMA-1 geni amino asit dizilimlerinin çoklu ve ikili hizalama analizleri sonucunda çalışmamızdan elde edilen Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2 izolatlarının Dünya'dan GenBank kaydı yapılmış diğer izolatlar ile %98,1-%100,0 oranlarında identiklik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2 izolatlarının kendi aralarında %99,832 oranında identik olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında, Kayseri/Turkey IV1 izolatı en yüksek identikliği %100,0'lük oranla İtalya'dan kaydı yapılmış, ACT46062 GenBank aksesyon numarasına sahip "ITA3" ve Meksika'dan kaydı yapılmış AET36932 GenBank aksesyon numarasına sahip "Turkey" izolatları ile göstermiştir. Yine çalışmamızdan elde edilen Kayseri/Turkey IT2 izolatının söz konusu "ITA3" ve "Turkey" izolatları ile %99,832 oranında identik olduğu da belirlenmiştir.

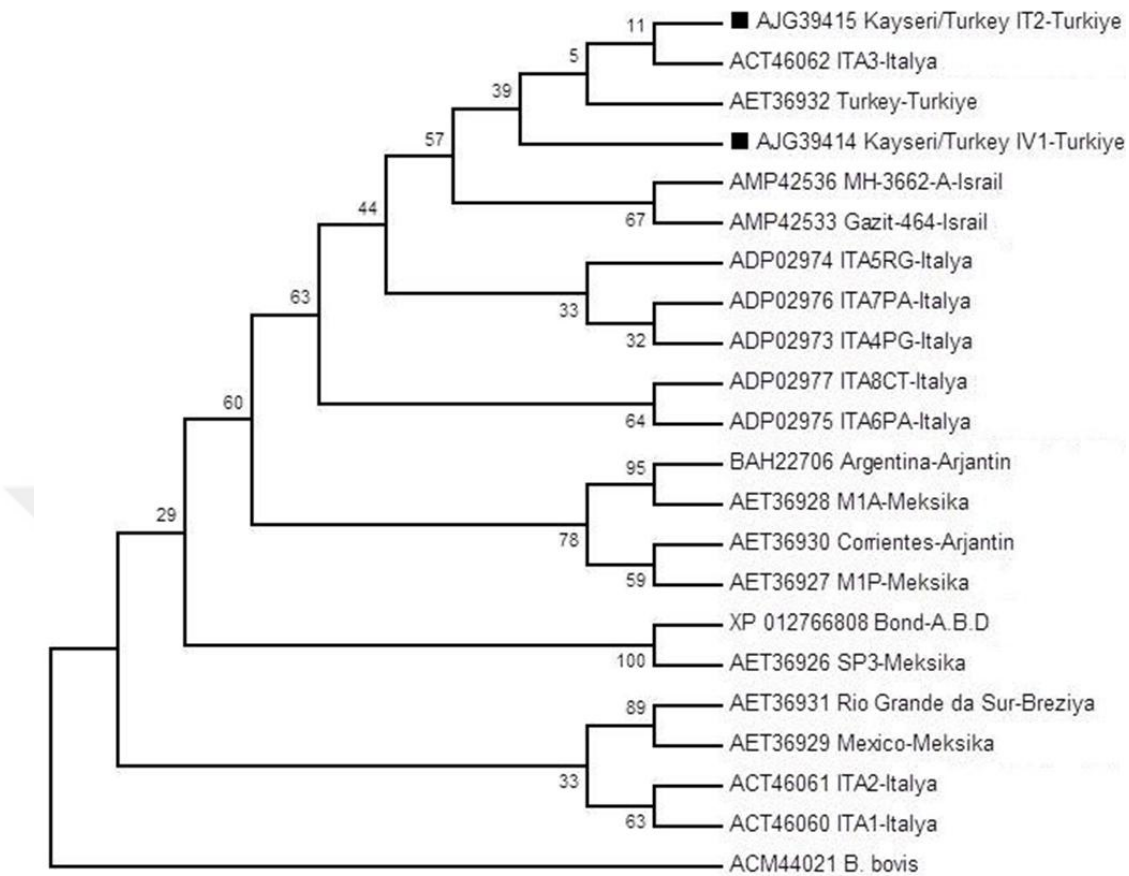
Nükleotid ve amino asit dizilimlerinin çoklu hizalama analizleri sonucunda elde edilen veriler filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu amaçla, Maximum Likelihood (ML) ve Bayesian analizleri (BA) uygulanmıştır. Nükleotid ve amino asit dizilimlerinin ML analizlerinde sekans evrimi için en uygun model jModelTest 0.0.1 (372) kullanılarak belirlenmiş ve en düşük AIC değerine göre Tamura-Nei+I+G (TN+I+G) modeli filogenetik ağaç oluşturulmasında kullanılmıştır. BA analizlerine sadece nükleotid dizilimlerinin hizalamaları dahil edilmiş ve uygun model belirlenmesinde yine jModelTest 0.0.1 (372) uygulanmıştır. En düşük BIC değerine göre Hasegawa-Kishino-Yano+I+G (HKY+I+G) modeli filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılmıştır. Filogenetik ağaç oluşumları Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Elde edilen izolatlar (kırmızı bold) ile GenBank'a kaydedilmiş BbigAMA-1 izolatlarının nükleotid dizilerinin Bayesian analiz yöntemi kullanılarak oluşturulmuş filogenetik ağacı. *B. bovis* BbigAMA-1 dış grup olarak kullanılmıştır. Kullanılan sekansların erişim numaraları, izolat isimleri ve orijinleri ağaçta gösterilmiştir. Birbirleri ile ilişkili taksonların filogenetik ağaçtaki tekrar yüzdeleri ağacın iç düğümlerinde gösterilmiştir (>%50)



Şekil 4.12. Elde edilen izolatlar (işaretli) ile GenBank'a kaydedilmiş BbigAMA-1 izolatlarının nükleotid dizilerinin ML analiz yöntemi kullanılarak oluşturulmuş filogenetik ağacı. *B. bovis* BbigAMA-1 dış grup olarak kullanılmıştır. Kullanılan sekansların erişim numaraları, izolat isimleri ve orijinleri ağaçta gösterilmiştir. Bootstrap testinde birbirleri ile ilişkili taksonların filogenetik ağaçtaki tekrar yüzdeleri ağacın iç düğümlerinde gösterilmiştir



Şekil 4.13. Elde edilen izolatlar (işaretli) ile GenBank'a kaydedilmiş BbigAMA-1 izolatlarının amino asit dizilerinin ML analiz yöntemi kullanılarak oluşturulmuş filogenetik ağacı. *B. bovis* BbigAMA-1 dış grup olarak kullanılmıştır. Kullanılan amino asit sekanslarının erişim numaraları, izolat isimleri ve orijinleri ağaçta gösterilmiştir. Bootstrap testinde birbirleri ile ilişkili taksonların filogenetik ağaçtaki tekrar yüzdeleri ağacın iç düğümlerinde gösterilmiştir

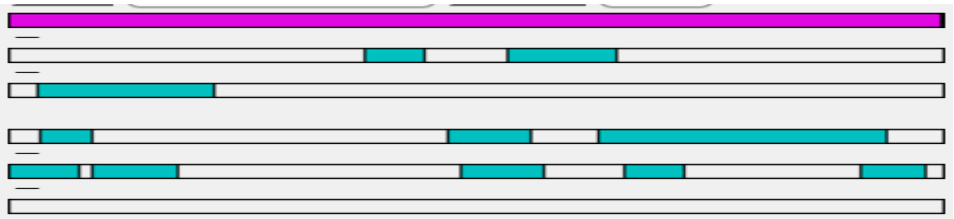
Bayesian (HKY+I+G) ve ML (TN+I+G) metotları ile oluşturulan filogenetik ağaçlarda (Şekil 4.11 ve 4.12) görüldüğü üzere Kayseri/Turkey IV1 ve IT2 izolatları "Turkey" ve "ITA3" izolatlarıyla aynı filogenetik branşta yer almıştır. Bununla birlikte orijin ülke bazında yapılan incelemelerde aynı ülkeden girilen izolatların genellikle aynı branşta yer aldıkları da görülmektedir. Ancak İtalya'dan elde edilmiş ITA serisi izolatlarda bu durum farklılık göstermiştir. ITA3 izolatı ITA1 ve ITA2'den farklı branşta ve çalışmamızdan elde ettiğimiz izolatlarla birlikte yer almıştır. Ayrıca, nükleotid dizileri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlarda ITA4PG; İtalya'dan bildirilen ITA8CT, ITA6PA ve ITA7PA izolatlarından farklı bir branşta tek başına yer almıştır. Ancak amino asit dizilimlerinin kullanıldığı filogenetik ağaç incelendiğinde (Şekil 4.13) ITA4PG'nin ITA5RG ve ITA7PA ile

aynı branşta yer aldığı, ITA8CT ve ITA6PA'nın ise İtalyadan bildirilen söz konusu üç izolattan farklı branşta yer aldığı görülmüştür.

Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2 izolatlarının amino asit dizilimleri; başlangıç ve bitiş sinyal kodonlarını belirlemek ve BbigAMA-1 fraksiyonlarını göstermek amacıyla web tabanlı ORF Finder (374) kullanılarak açık okuma çerçevesi (open reading frame, ORF) analizlerine tabii tutulmuştur. Analizler sonucunda belirlenen çerçeveler Tablo 4.5 ile Şekil 4.14 ve 4.15'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. ORF analizleri sonucu nükleotid dizilimlerinde belirlenen çerçeveler

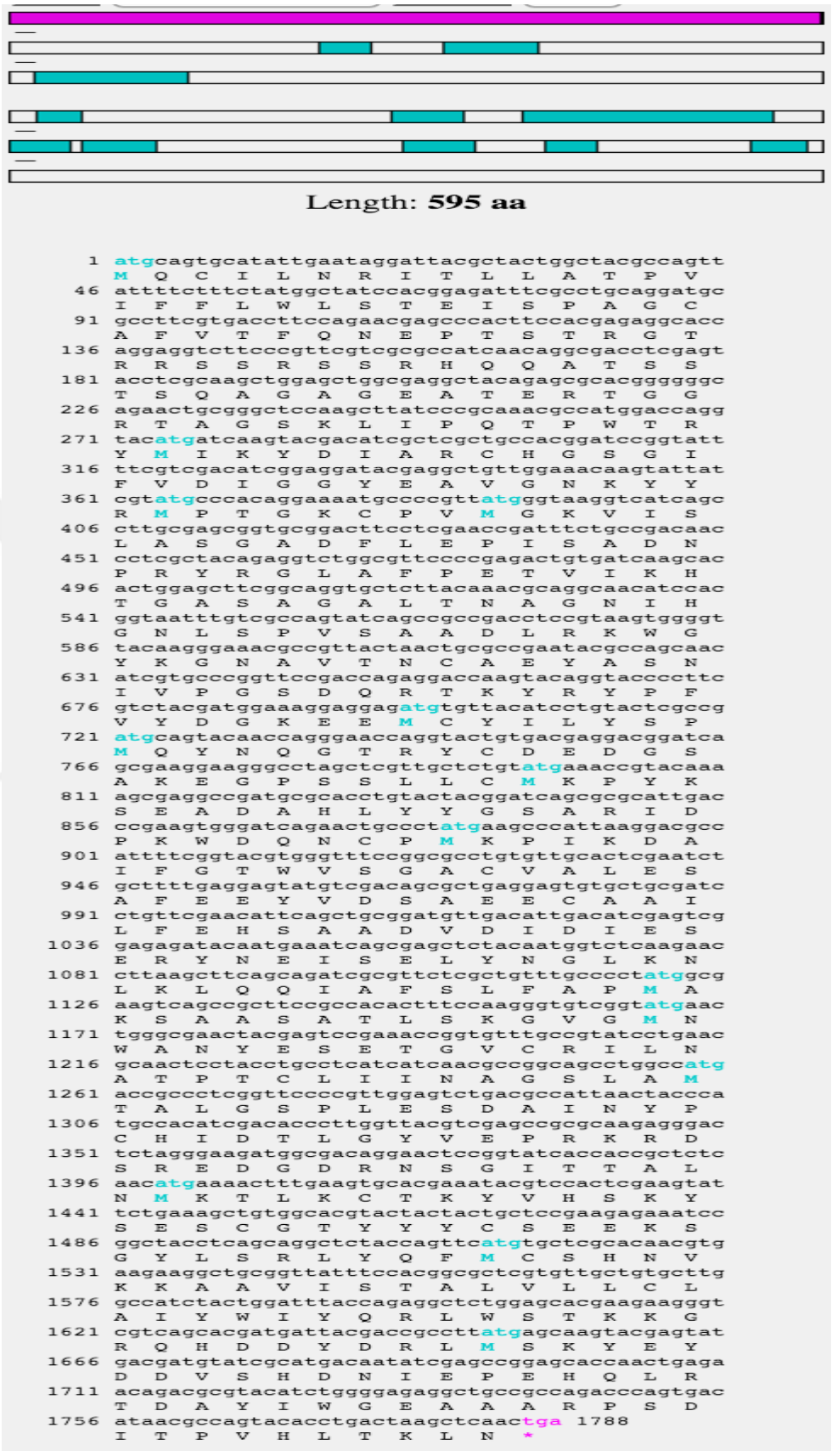
Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2			
Çerçeve	**Başlangıç Nükleotidi**	**Bitiş Nükleotidi**	**Nükleotid Uzunluğu**
+1	1	1787	1788
-1	1129	1680	552
+3	57	395	339
+2	959	1168	210
-2	162	326	165
-2	867	1028	162
-1	841	1002	162
-2	1	137	137
-2	1635	1757	123
-2	1179	1295	117
+2	683	799	117
-1	61	162	102



Length: **595 aa**

```
   1 atgcagtgcatattgaataggattacgctactggctacgccagtt
     M  Q  C  I  L  N  R  I  T  L  L  A  T  P  V
  46 attttctttctatggctatccacggagatttcgcctgcaggatgc
     I  F  F  L  W  L  S  T  E  I  S  P  A  G  C
  91 gccttcgtgaccttccagaacgagcccacttccacgagaggcacc
     A  F  V  T  F  Q  N  E  P  T  S  T  R  G  T
 136 aggaggtcttcccgttcgtcgcgccatcaacaggcgacctcgagt
     R  R  S  S  R  S  S  R  H  Q  Q  A  T  S  S
 181 acctcgcaagctggagctggcgaggctacagagcgcacggggggc
     T  S  Q  A  G  A  G  E  A  T  E  R  T  G  G
 226 agaactgcgggctccaagcttatcccgcaaacgccatggaccagg
     R  T  A  G  S  K  L  I  P  Q  T  P  W  T  R
 271 tacatgatcaagtacgacatcgctcgctgccacggatccggtatt
     Y  M  I  K  Y  D  I  A  R  C  H  G  S  G  I
 316 ttcgtcgacatcggaggatacgaggctgttggaaacaagtattat
     F  V  D  I  G  G  Y  E  A  V  G  N  K  Y  Y
 361 cgtatgcccacaggaaaatgccccgttatggtaaggtcatcagc
     R  M  P  T  G  K  C  P  V  M  G  K  V  I  S
 406 cttgcgagcggtgcggacttcctcgaaccgatttctgccgacaac
     L  A  S  G  A  D  F  L  E  P  I  S  A  D  N
 451 cctcgctacagaggtctggcgttccccgagactgtgatcaagcac
     P  R  Y  R  G  L  A  F  P  E  T  V  I  K  H
 496 actggagcttcggcaggtgctcttacaaacgcaggcaacatccac
     T  G  A  S  A  G  A  L  T  N  A  G  N  I  H
 541 ggtaatttgtcgccagtatcagccgccgacctccgtaagtggggt
     G  N  L  S  P  V  S  A  A  D  L  R  K  W  G
 586 tacaagggaaacgccgttactaactgcgccgaatacgccagcaac
     Y  K  G  N  A  V  T  N  C  A  E  Y  A  S  N
 631 atcgtgcccggttccgaccagaggaccaagtacaggtacccctttc
     I  V  P  G  S  D  Q  R  T  K  Y  R  Y  P  F
 676 gtctacgatggaaaggaggagatgtgttacatcctgtactcgccg
     V  Y  D  G  K  E  E  M  C  Y  I  L  Y  S  P
 721 atgcagtacaaccagggaaccaggtactgtgacgaggacggatca
     M  Q  Y  N  Q  G  T  R  Y  C  D  E  D  G  S
 766 gcgaaggaagggcctagctcgttgctctgtatgaaaccgtacaaa
     A  K  E  G  P  S  S  L  L  C  M  K  P  Y  K
 811 agcgaggccgatgcgcacctgtactacggatcagcgcgcattgac
     S  E  A  D  A  H  L  Y  Y  G  S  A  R  I  D
 856 ccgaagtgggatcagaactgccctatgaagcccattaaggacgcc
     P  K  W  D  Q  N  C  P  M  K  P  I  K  D  A
 901 attttcggtacgtgggtttccggcgcctgtgttgcactcgaatct
     I  F  G  T  W  V  S  G  A  C  V  A  L  E  S
 946 gcttttgaggagtatgtcgacagcgctgaggagtgtgctgcgatc
     A  F  E  E  Y  V  D  S  A  E  E  C  A  A  I
 991 ctgttcgaacattcagctgcggatgttgacattgacatcgagtcg
     L  F  E  H  S  A  A  D  V  D  I  D  I  E  S
1036 gagagatacaatgaaatcagcgagctctacaatggtctcaagaac
     E  R  Y  N  E  I  S  E  L  Y  N  G  L  K  N
1081 cttaagcttcagcagatcgcgttctcgctgtttgcccctatggcg
     L  K  L  Q  Q  I  A  F  S  L  F  A  P  M  A
1126 aagtcagccgcttccgccacactttccaagggtgtcggtatgaac
     K  S  A  A  S  A  T  L  S  K  G  V  G  M  N
1171 tgggcgaactacgagtccgaaaccggtgtttgccgtatcctgaac
     W  A  N  Y  E  S  E  T  G  V  C  R  I  L  N
1216 gcaactcctacctgcctcatcatcaacgccggcagcctggccatg
     A  T  P  T  C  L  I  I  N  A  G  S  L  A  M
1261 accgccctcggttccccgttggagtctgacgccattaactaccca
     T  A  L  G  S  P  L  E  S  D  A  I  N  Y  P
1306 tgccacatcgacaccctggttacgtcgagccgcgcaagagggac
     C  H  I  D  T  L  G  Y  V  E  P  R  K  R  D
1351 tctagggaagatggcgacaggaactccggtatcaccaccgctctc
     S  R  E  D  G  D  R  N  S  G  I  T  T  A  L
1396 aacatgaaaactttgaagtgcacgaaatacgtccactcgaagtat
     N  M  K  T  L  K  C  T  K  Y  V  H  S  K  Y
1441 tctgaaagctgtggcacgtactactactgctccgaagagaaatcc
     S  E  S  C  G  T  Y  Y  Y  C  S  E  E  K  S
1486 ggctacctcagcaggctctaccagttcatgtgctcgcacaacgtg
     G  Y  L  S  R  L  Y  Q  F  M  C  S  H  N  V
1531 aagaaggctgcggttatttccacggcgctcgtgtttgctgtgcttg
     K  K  A  A  V  I  S  T  A  L  V  L  L  C  L
1576 gccatctactggatttaccagaggctctggagcacgaagaagggt
     A  I  Y  W  I  Y  Q  R  L  W  S  T  K  K  G
1621 cgtcagcacgatgattacgaccgccttatgagcaagtacgagtat
     R  Q  H  D  D  Y  D  R  L  M  S  K  Y  E  Y
1666 gacgatgtatcgcatgacaatatcgagccggagcaccaactgaga
     D  D  V  S  H  D  N  I  E  P  E  H  Q  L  R
1711 acagacgcgtacatctggggagaggctgccgccagacccagtgac
     T  D  A  Y  I  W  G  E  A  A  A  R  P  S  D
1756 ataacgccagtacacctgactaagctcaactga 1788
     I  T  P  V  H  L  T  K  L  N  *
```

Şekil 4.14. Kayseri/Turkey IV1 izolatının +1 çerçevesi başlangıç ve bitiş kodonları



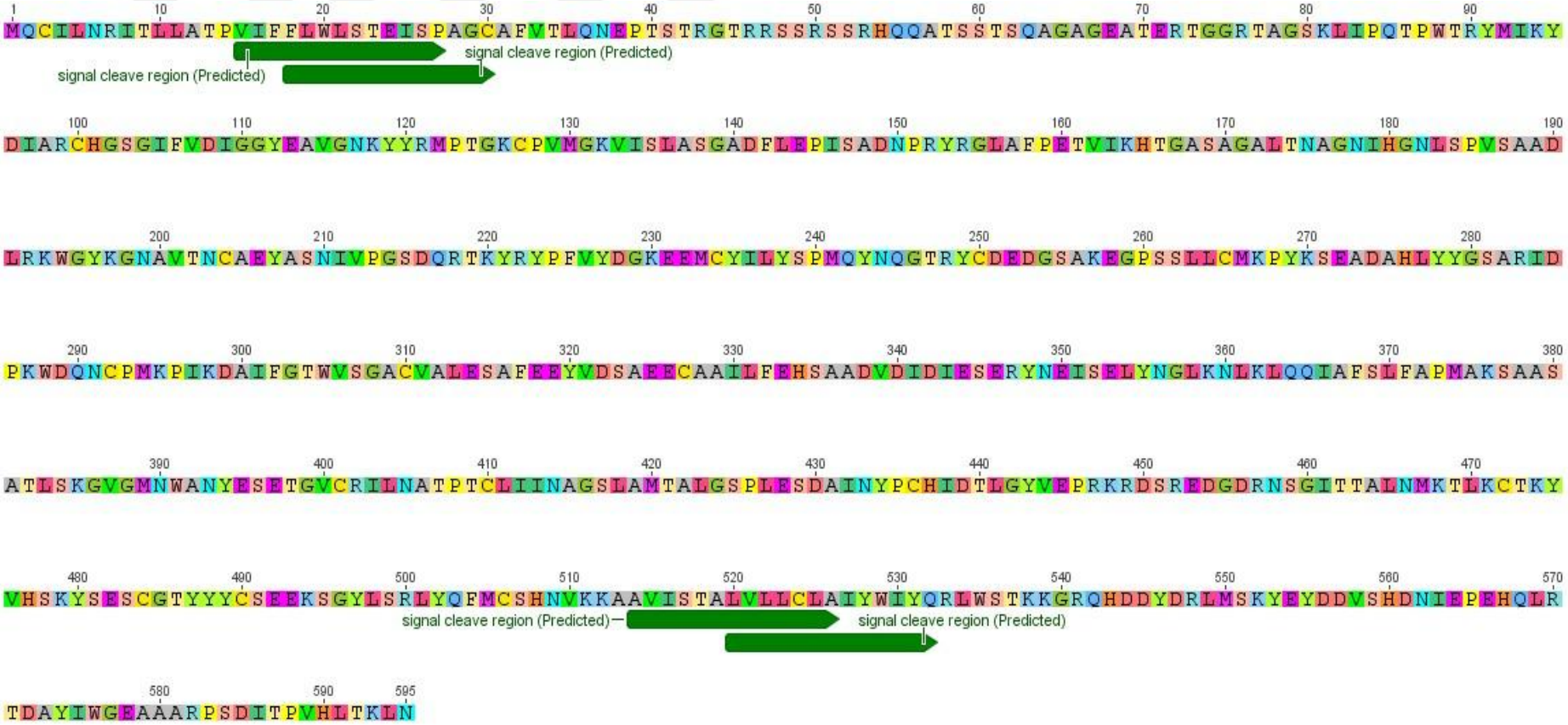
Şekil 4.15. Kayseri/Turkey IT2 izolatının +1 çerçevesi başlangıç ve bitiş kodonları

Her iki izolat için belirlenen çerçeveler içerisinde 1788 baz uzunluğuna sahip BbigAMA-1 geninin tamamını kodlayan +1 numaralı çerçeve ekspresyon analizleri için seçilmiştir.

Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2 BbigAMA-1 izolatlarının amino asit dizilimleri Geneious R8 (369) yazılımı üzerinden EMBOSS Protein Analysis 1.0 programında analiz edilmiş ve sinyal peptid varlığı yönünden araştırılmıştır. Analiz sonuçları Şekil 4.16 ve 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.16. Kayseri/Turkey IV1 izolatının amino asit diziliminin sinyal peptid analizi sonucu tahmini sinyal peptid içeren bölgeler (yeşil)



Şekil 4.17. Kayseri/Turkey IT2 izolatının amino asit diziliminin sinyal peptid analizi sonucu tahmini sinyal peptid içeren bölgeler (yeşil)

Şekil 4.16 ve 4.17'de gösterildiği gibi yapılan analizler sonucunda Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2 BbigAMA-1 izolatlarının amino asit dizilimlerinin sinyal peptid içerdiği tespit edilmiştir. Ancak ekspresyon analizleri öncesinde doğal protein yapısının bozulmaması ve protein katlanma yerlerinde (protein folding) herhangi bir değişikliğin oluşmaması için bu kısımlar amino asit dizilimlerinden çıkartılmamış ve proteinler doğal şekilleriyle ekspresyon analizlerine tabii tutulmuşlardır.

BbigAMA-1 amino asit dizilimlerindeki tahmini antijenik peptidlerin varlığı Geneious R8 (369) yazılımı üzerinden EMBOSS Protein Analysis 1.0 programı kullanılarak araştırılmış ve sonuçlar Şekil 4.18 ve 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.18. Kayseri/Turkey IV1 izolatının antijenik peptid bölgelerinin analizi sonucu elde edilen tahmini antijenik bölgeler (kırmızı)



Şekil 4.19. Kayseri/Turkey IT2 izolatının antijenik peptid bölgelerinin analizi sonucu elde edilen tahmini antijenik bölgeler (kırmızı)

Şekil 4.18 ve 4.19'da da verildiği gibi her iki izolatın da 22 ayrı antijenik bölgeye sahip olduğu belirlenmiştir. En uzun tahmini antijenik bölgenin ise 496. ve 534. amino asitler arasında olabileceği görülmüştür.

BbigAMA-1 proteinlerinin transmembran sarmallarının analizleri ise Geneious R8 (369) yazılımı üzerinden Transmembrane Prediction Tool 0.9 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları Şekil 4.20 ve 4.21 de verilmiştir.



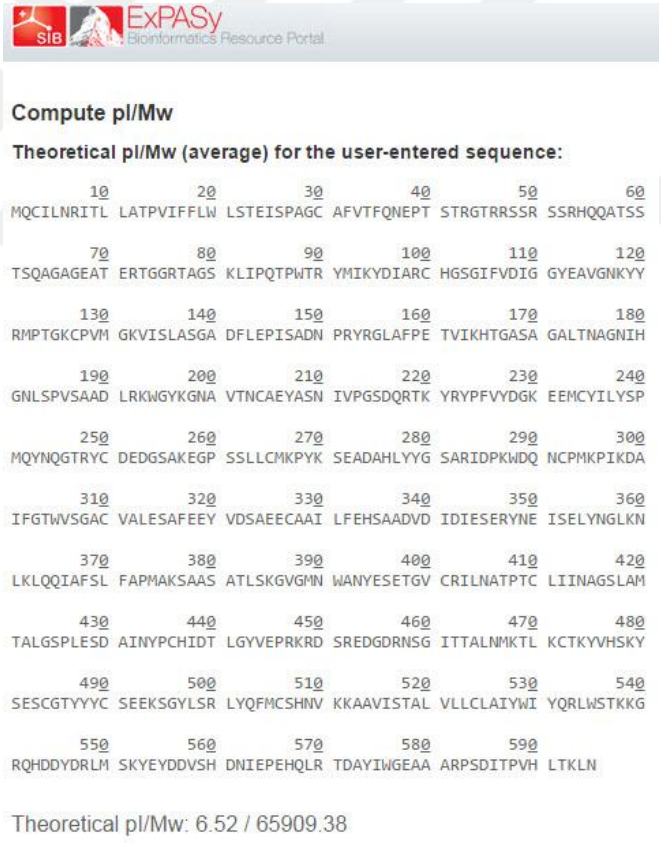
Şekil 4.20. Kayseri/Turkey IV1 izolatının; potansiyel sitoplazmik ve ekstraselüler (mavi) bölgeleri ile transmembran bölgesi (kırmızı)



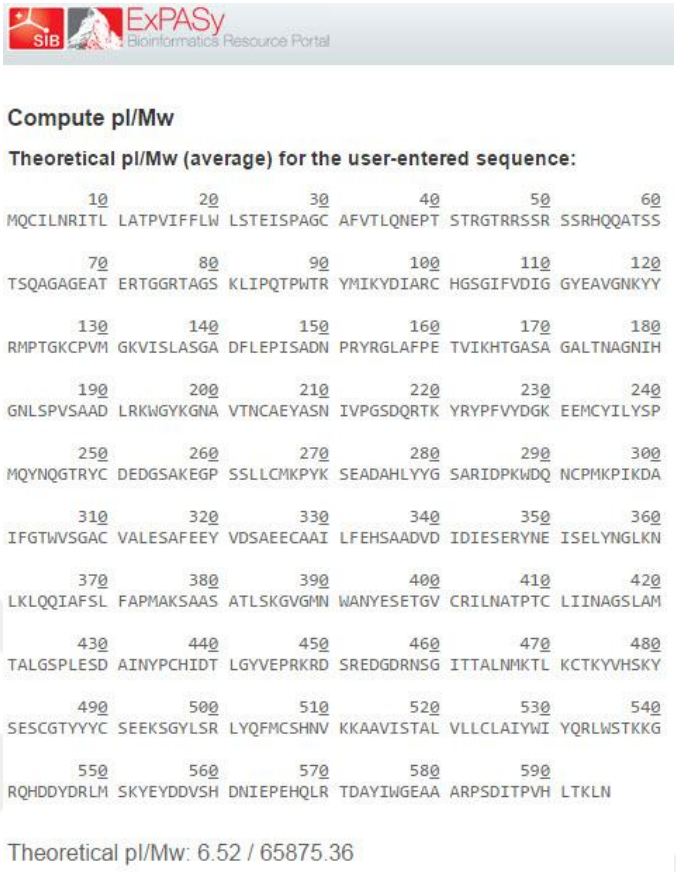
Şekil 4.21. Kayseri/Turkey IT2 izolatının; potansiyel sitoplazmik ve ekstrasellüler (mavi) bölgeleri ile transmembran bölgesi (kırmızı)

Transmembran analizleri sonucunda, Şekil 4.20 ve 4.21'de de görüldüğü gibi potansiyel sitoplazmik, ekstrasellüler ve transmembran bölgelerin yerleri tespit edilmiştir. Buna göre her iki izolat için 1. ve 512. amino asitler arası sitoplazmik, 513. ve 532. amino asitler arası transmembran ve 533. ile 595. amino asitler arası ise ekstrasellüler bölge olarak belirlenmiştir.

SDS PAGE ve Western Blot analizleri öncesinde elde edilecek olan rekombinant proteinlerin tahmini moleküler ağırlıklarını hesaplamak ve hedef bölgede analiz sonuçlarını değerlendirebilmek amacıyla her iki izolat için mevcut amino asit dizilimleri ExPASy (375-377) programı ile işleme tabii tutulmuştur. Ayrıca söz konusu programla izoelektrik nokta değerleri de hesaplanmış ve Şekil 4.22 ve 4.23 de verilmiştir.



Şekil 4.22. Kayseri/Turkey IV1 izolatının amino asit dizilimlerine göre tahmini izoelektrik nokta değeri (pI) ve moleküler ağırlığı



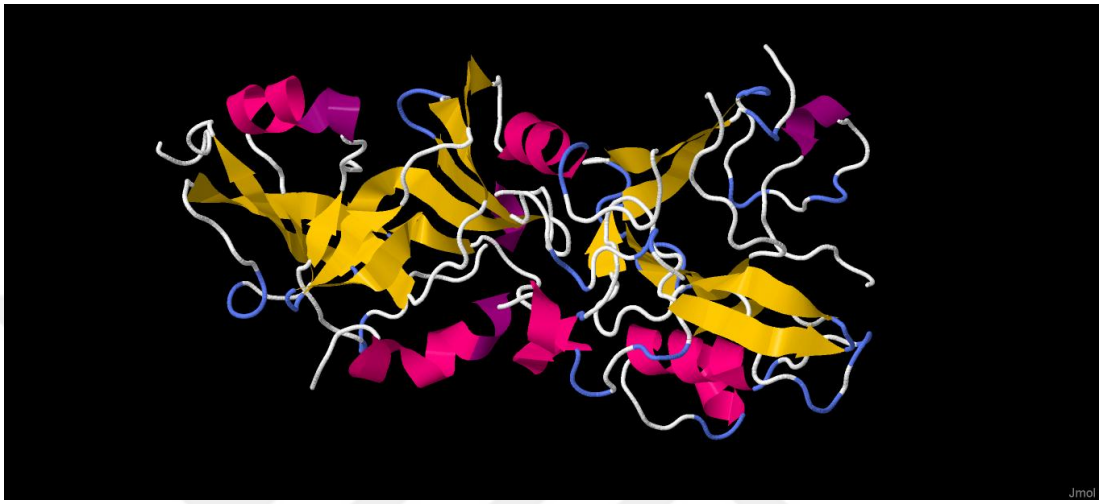
Şekil 4.23. Kayseri/Turkey IT2 izolatının amino asit dizilimlerine göre tahmini izoelektrik nokta değeri (pI) ve moleküler ağırlığı

Şekil 4.22 ve 4.23'de verildiği gibi Kayseri/Turkey IV1 için tahmini izoelektrik nokta değeri 6,52, moleküler ağırlık ise 65,90938 kDa olarak bulunurken bu değerler Kayseri/Turkey IT2 için 6,52 ve 65,87536 kDA olarak hesaplanmıştır. Böylelikle yapılacak analizlerde hedef proteinin 65 kDA civarında görülebileceği anlaşılmıştır.

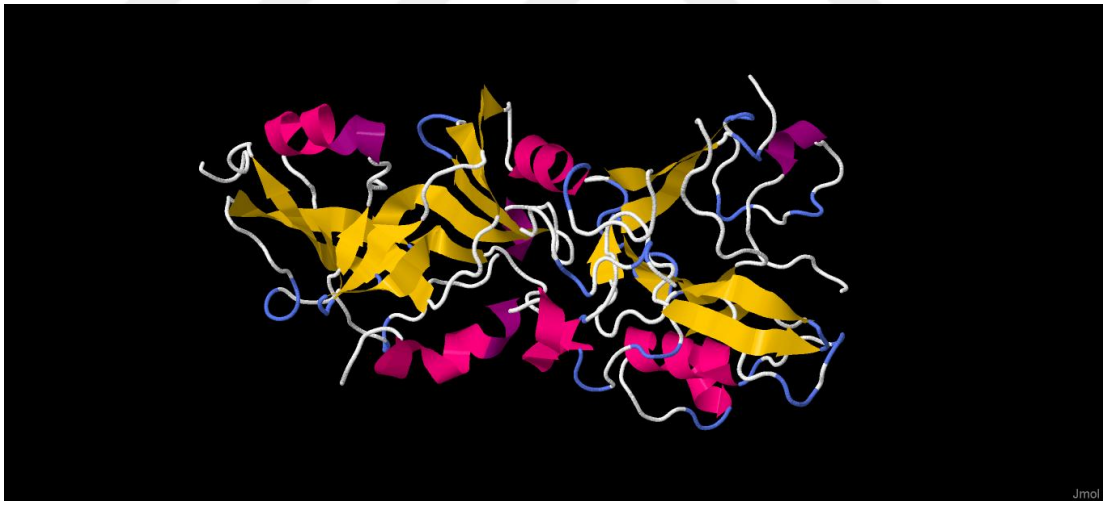
GenBank kaydı yapılmış olan BbigAMA-1 izolatlarının nükleotid dizilimleri, polimorfik alanların hesaplanması ve haplotip sayılarının belirlenmesi amacıyla Proseq3 yazılımında analiz edilmiştir. Nükleotid dizilimlerinin analizleri sonucunda, sekans dizilimleri arasında, 21 farklı haplotipi ortaya koyan 448 polimorfik alan olduğu tespit edilmiştir.

Kayseri Turkey IV1 ve Kayseri Turkey IT2 izolatlarının nükleotid dizilimleri arasındaki polimorfik alanların hesaplanması ve haplotip sayılarının belirlenmesi analizleri sonucunda ise bu iki izolatın ayrı birer haplotip oldukları belirlenmiş ve 4 adet polimorfik alana sahip oldukları tespit edilmiştir.

DNA dizi analiz sonuçlarına göre her iki izolat için BbigAMA-1 proteinlerinin üç boyutlu yapısı Phyre2 Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0 programı (379) ile Jmol: An open-source Java viewer (380) programı kullanılarak elde edilmiştir ve Şekil 4.24 ve 4.25'de verilmiştir.



Şekil 4.24. Kayseri/Turkey IV1 BbigAMA-1 proteinin üç boyutlu yapısı



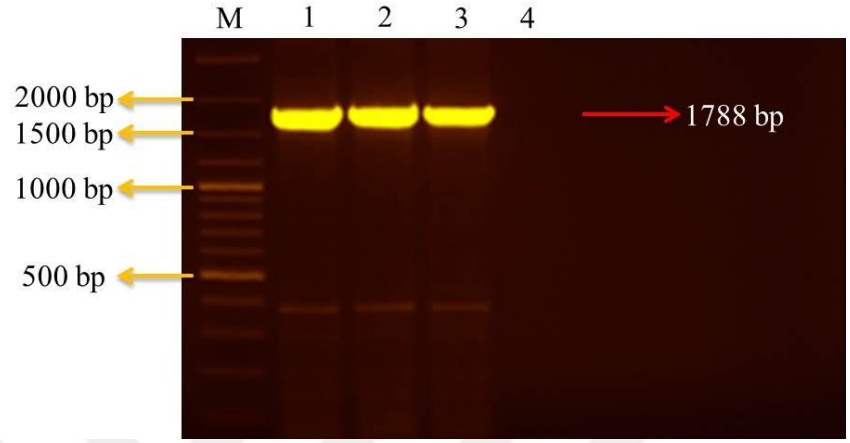
Şekil 4.25. Kayseri/Turkey IT2 BbigAMA-1 proteinin üç boyutlu yapısı

4.4. BBIGAMA-1 PROTEİNLERİNİN EKPRESYON SONUÇLARI

4.4.1. PCR Sonucu

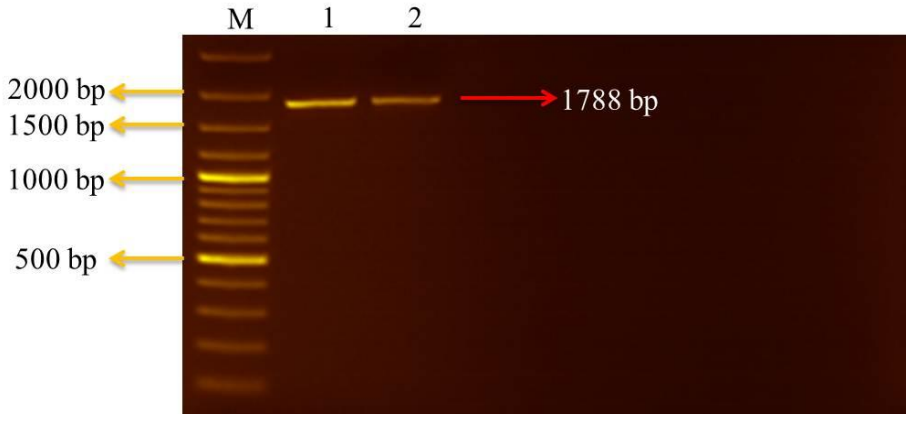
RNA izolasyonunu takiben cDNA sentezi yapılan örnekler ekspresyon analizleri öncesinde plazmid vektörüne klonlama amacıyla yeni dizayn edilen primer çifti kullanılarak PCR işlemine tabii tutulmuşlardır. PCR sonrası elde edilen amplikonlar

%1,5'luk agaroz jelde CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı ile görüntülenmiş ve 1788 bp büyüklüğünde bant veren DNA fragmentleri Şekil 4.26'da gösterilmiştir.



Şekil 4.26. *Babesia bigemina*'nın *in vivo* ve *in vitro* pasajlarından elde edilmiş Kayseri/Türkiye suşları cDNA'larının ekspresyon primerleriyle amplifikasyonu sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüsü. M: Marker; 1: *B. bigemina in vivo* örnek; 2: *B. bigemina in vitro* örnek; 3: Pozitif kontrol (*B. bigemina in vitro* gDNA); 4: Negatif kontrol

Elektroforez görüntüleme sonucunda hedef baz aralığında görünen bantlar, ilgili genin ekspresyon vektörüne klonlanması öncesinde jelden ekstrakte edilmiştir. Jel ekstraksiyon sonucu elde edilen örnekler %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı ile görüntülenmiştir (Şekil 4.27).

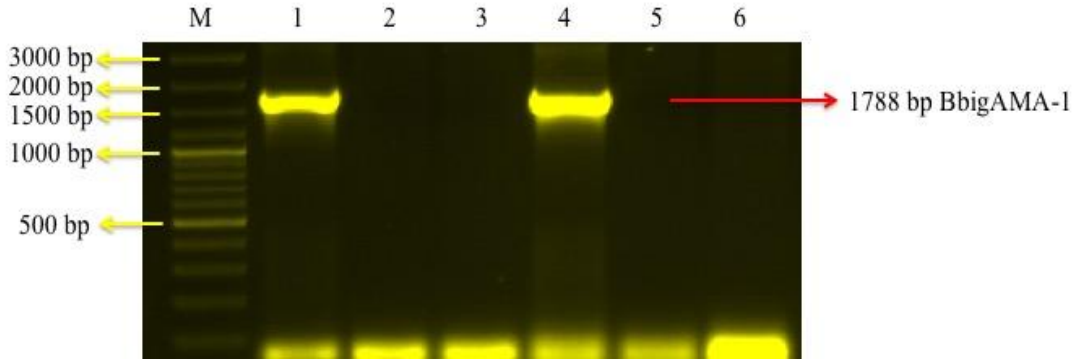


Şekil 4.27. Jel ekstraksiyon sonucu elde edilen örneklerin jel elektroforezde görüntüsü. M: Marker; 1: *B. bigemina in vivo* jel pürifiye örnek; 2: *B. bigemina in vitro* jel pürifiye örnek

4.4.2. pET 100/D-TOPO Ekspresyon Vektörüne Klonlama Sonuçları

Jelden ekstraksiyonu sonucu elde edilen jel pürifiye örnekler Champion™ pET Directional TOPO Expression Kit (Invitrogen, ABD) kullanılarak pET 100/D-TOPO vektörü (Invitrogen, ABD) klonlanmıştır. Daha sonra ligasyon ürünü OneShot TOP 10 *E. coli* (Invitrogen, ABD) kompetan hücrelere transforme edilmiştir. LB katı besiyerinde üreyen kolonilerden seçilen tek koloniler, transformasyon etkinliğini artırmak amacıyla steril pipet uçları ile alınıp ayrı ayrı tekrar LB katı besiyerine ekilmiştir.

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerde hedef gen bölgesinin vektöre klonlandığı ve transformasyon etkinliği BbigAMA-1 ekspresyon primerleriyle koloni PCR yapılarak teyit edilmiştir. Koloni PCR sonuçları elde edilen agaroz jel görüntüsü Şekil 4.28'de gösterilmiştir. Agaroz jelin CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı ile incelenmesi sonucu BbigAMA-1'in her iki suş için de başarılı bir şekilde transforme olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.28. Transforme hücrelerde BbigAMA-1 genlerinin koloni PCR'ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü. M: Marker; 2,3,5,6: Negatif koloniler; 1: *in vitro* BbigAMA-1 pozitif koloni; 4: *in vivo* BbigAMA-1 pozitif koloni

Koloni PCR sonuçlarını takiben pozitif saptanan tek bir koloni seçilerek sıvı besi yerine aktarılmış ve bir gece 37 °C'de inkubasyondan sonra üreyen transforme hücreler santrifüj ile çöktürülmüştür. Daha sonra transforme hücrelerden plazmid pürifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

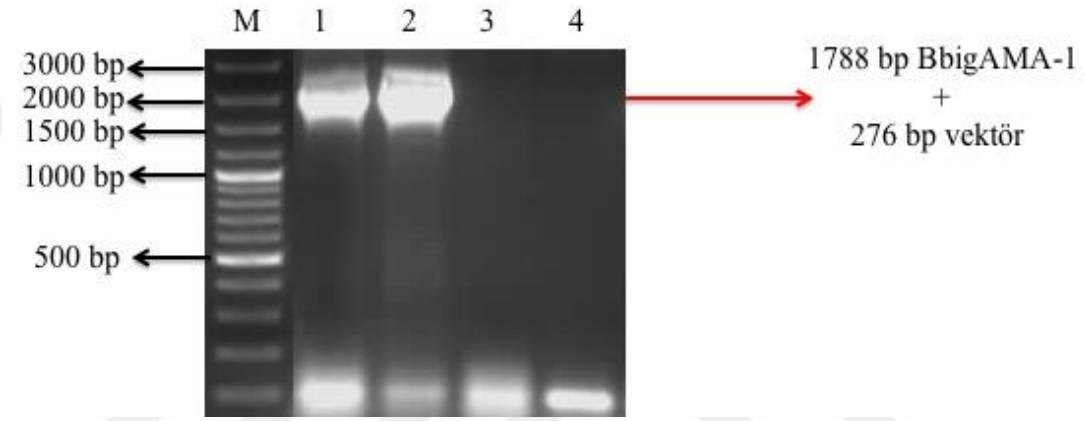
4.4.3. Saflaştırılan Rekombinant Plazmidlerin Kontrol PCR Sonuçları

Saflaştırılan rekombinant plazmidlerin BbigAMA-1 genini içerip içermediği ve N-C terminal uçlarının doğru oryantasyonda yerleşip yerleşmediğinin kontrolü amacıyla

çapraz PCR protokolleri uygulanmıştır. Sonuçlar aşağıda her PCR için ayrı ayrı verilmiştir.

Çapraz PCR 1 Sonuçları:

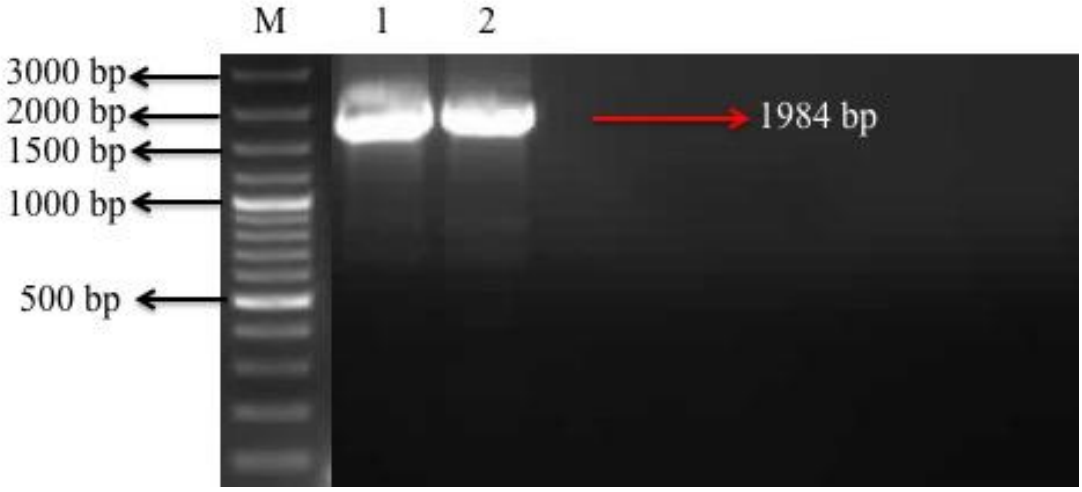
Çapraz PCR 1 analizlerinde T7 promotor forward ve T7 reverse primerleri kullanılmıştır. Bu PCR sonucunda elde edilen 2064 bp büyüklüğündeki hedef bantlar Şekil 4.29'da gösterilmiştir.



Şekil 4.29. Çapraz PCR 1 analizleri sonucu amplikonların jel agarozda görünümü. M: Marker; 1: *in vitro* BbigAMA-1 rekombinant plazmidi; 2: *in vivo* BbigAMA-1 rekombinant plazmidi. 3,4: Negatif kontroller

Çapraz PCR 2 Sonuçları:

Çapraz PCR 2 analizlerinde T7 promotor forward ve BbigAMA-1 genine ait AMAexR reverse primerleri kullanılmıştır. Bu PCR sonucunda elde edilen 1984 bp büyüklüğündeki hedef bantlar Şekil 4.30'da gösterilmiştir.



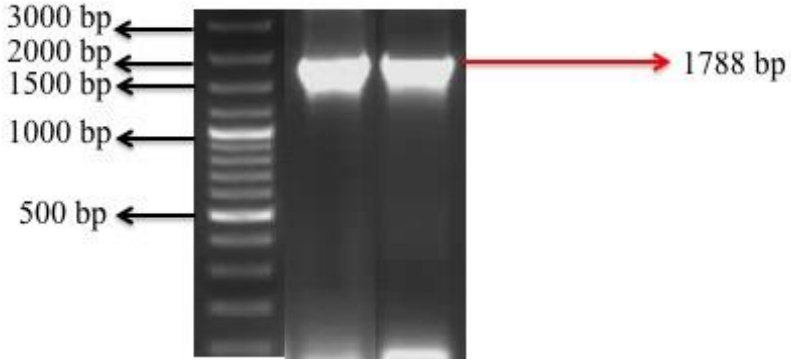
Şekil 4.30. Çapraz PCR 2 analizleri sonucu amplikonların jel agarozda görünümü. M: Marker; 1: *in vitro* BbigAMA-1 rekombinant plazmidi; 2: *in vivo* BbigAMA-1 rekombinant plazmidi

Çapraz PCR 3 Sonuçları:

Çapraz PCR 3 analizlerinde T7 promotor forward ve BbigAMA-1 genine ait AMAexF forward primerleri kullanılmıştır. Bu PCR sonucunda herhangi bir baz aralığında bant oluşumları görülmemiştir.

Çapraz PCR 4 Sonuçları:

Çapraz PCR 4 analizleri çapraz PCR 1'in tekrar konfirme edilmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla BbigAMA-1 genine ait AMAexF forward ve AMAexR reverse primerleri kullanılmıştır. Bu PCR sonucunda elde edilen 1788 bp büyüklüğündeki hedef bantlar Şekil 4.31'de gösterilmiştir.



Şekil 4.31. Çapraz PCR 4 analizleri sonucu amplikonların jel agarozda görünümü. M: Marker; 1: *in vitro* BbigAMA-1 rekombinant plazmidi; 2: *in vivo* BbigAMA-1 rekombinant plazmidi

Çapraz PCR analizleri sonucunda, rekombinant proteinin sentezlenebilmesi için, plazmidin TOPO kısmından hemen sonra, BbigAMA-1 geninin başlangıç kodonunun geldiği anlaşılmış ve BbigAMA-1 geninin N ve C terminal uçlarının her iki suş için doğru oryantasyonda vektöre insert olduğu belirlenmiştir. Böylece yanlış bir oryantasyonda, BbigAMA-1 geninin stop kodonunun N-terminal kısma gelmesi durumunda meydana gelebilecek problemlerin önüne geçilmiştir.

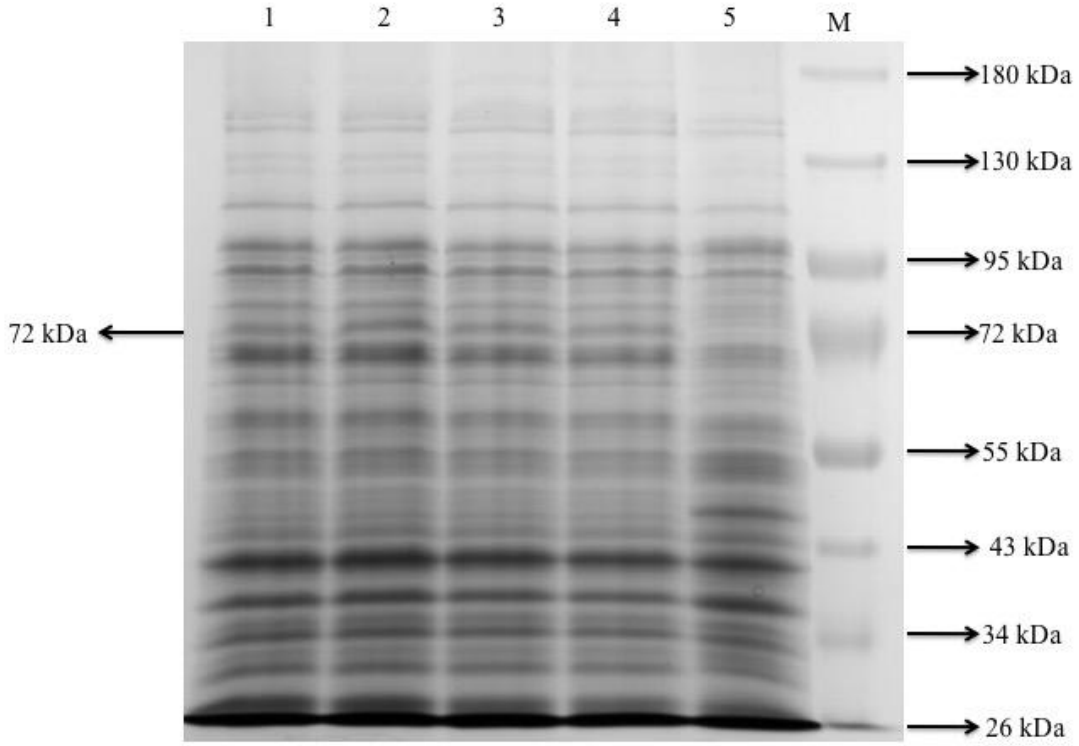
4.4.4. Pilot Ekspresyon Deneme Sonuçları

İdeal bir ekspresyon için gerekli olan IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) miktarını belirlemek ve optimum indükleme saatini saptamak amacıyla pilot ekspresyon denemeleri yapılmıştır.

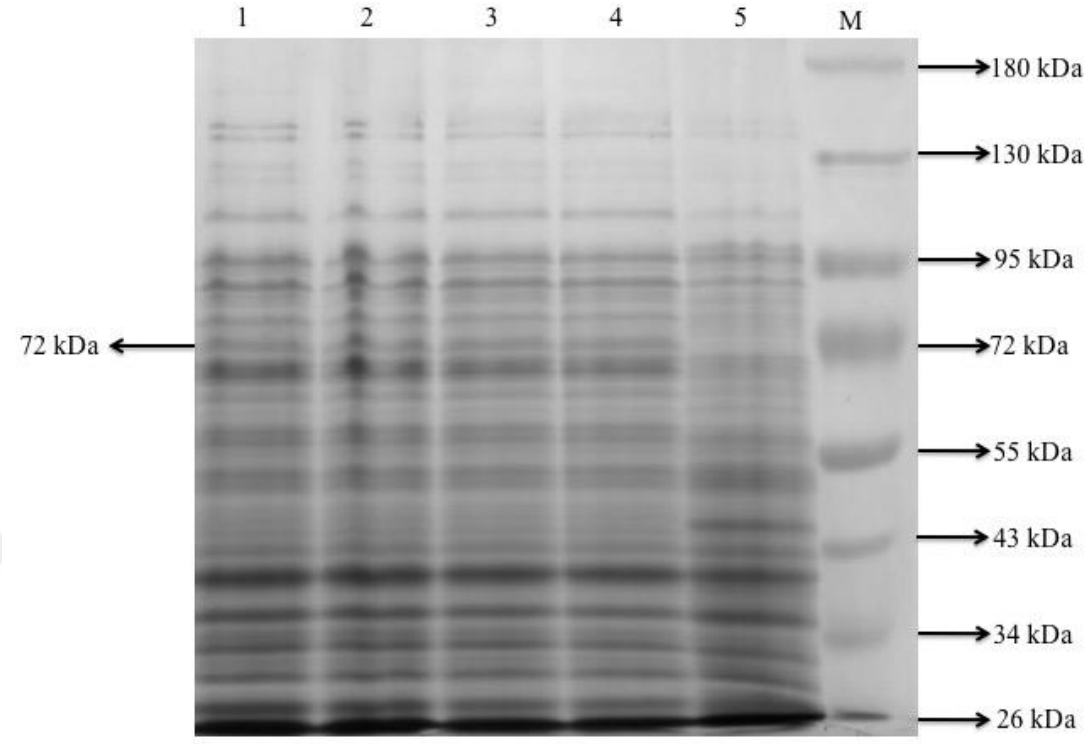
IPTG optimizasyonunda 0,00001; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1 ve 2 mM olmak üzere çeşitli IPTG miktarları denenmiş ve 37 °C'de inkubasyona bırakılan besi yerlerinden 0-6 saat aralığında her saat örnek alınarak aynı zamanda optimum indükleme saati de tespit edilmiştir. Ekspresyon seviyeleri karşılaştırmalı olarak SDS-PAGE ve Western Blot analizleri ile görüntülenmiştir.

4.4.4.1. SDS-PAGE Analizleri Sonuçları

Farklı IPTG oranlarında yapılan indüklemelerde 0-6. saatler arası alınan örneklerin SDS-PAGE analizleri Fusion FX5 (Vilber Lourmat, Germany) ile görüntülenmiş ve analizlerin sonuçlarının bazı görüntüleri Şekil 4.32 ve 4.33'de sunulmuştur.



Şekil 4.32. *In vivo* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin SDS-PAGE analizi görüntüsü. 1: 1. saat, 2 mM IPTG indükleme; 2: 2. saat 0,00001 mM IPTG indükleme; 3: 2. saat 0,0001 mM IPTG indükleme; 4: 2. saat 0,001 mM IPTG indükleme; 5: Negatif kontrol (*E. coli* BL21); M: Marker



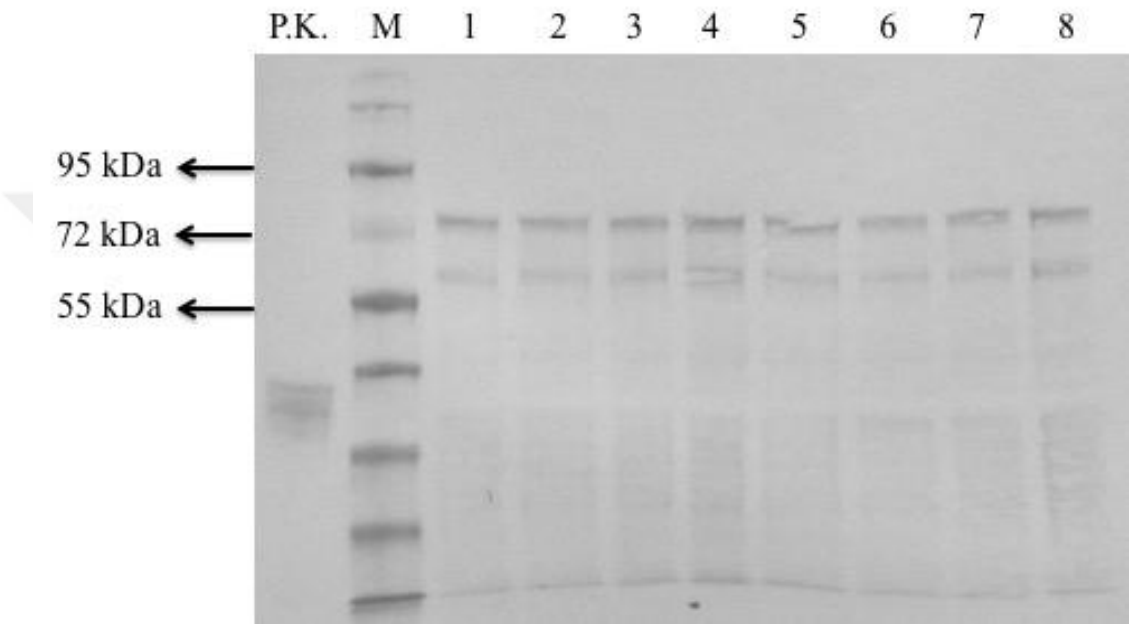
Şekil 4.33. *In vitro* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin 5. saate göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin SDS-PAGE analizi görüntüsü. 1: 0,00001 mM IPTG indükleme; 2: 0,0001 mM IPTG indükleme; 3: 0,001 mM indükleme; 4: 0,01 mM IPTG indükleme; 5: Negatif kontrol (*E. coli* BL21); M: Marker

SDS-PAGE analizleri sonucunda *in vivo* ve *in vitro* BbigAMA-1 proteinlerinin başarılı bir şekilde eksprese oldukları belirlenmiş ve optimum ekspresyon süreleri ile IPTG indükleme miktarları saptanmıştır. Analiz sonuçlarına göre 37 °C'de gerçekleştirilen ekspresyonlarda *in vivo* BbigAMA-1 proteinleri için ideal ekspresyonun 0,00001 mM IPTG indüklemesiyle 2. saatte gerçekleştiği tespit edilmiştir. *In vitro* BbigAMA-1 proteinlerinin ise 0,01 mM IPTG indüklemesiyle 5. saatte en iyi ekspresyon seviyesine ulaştığı belirlenmiştir.

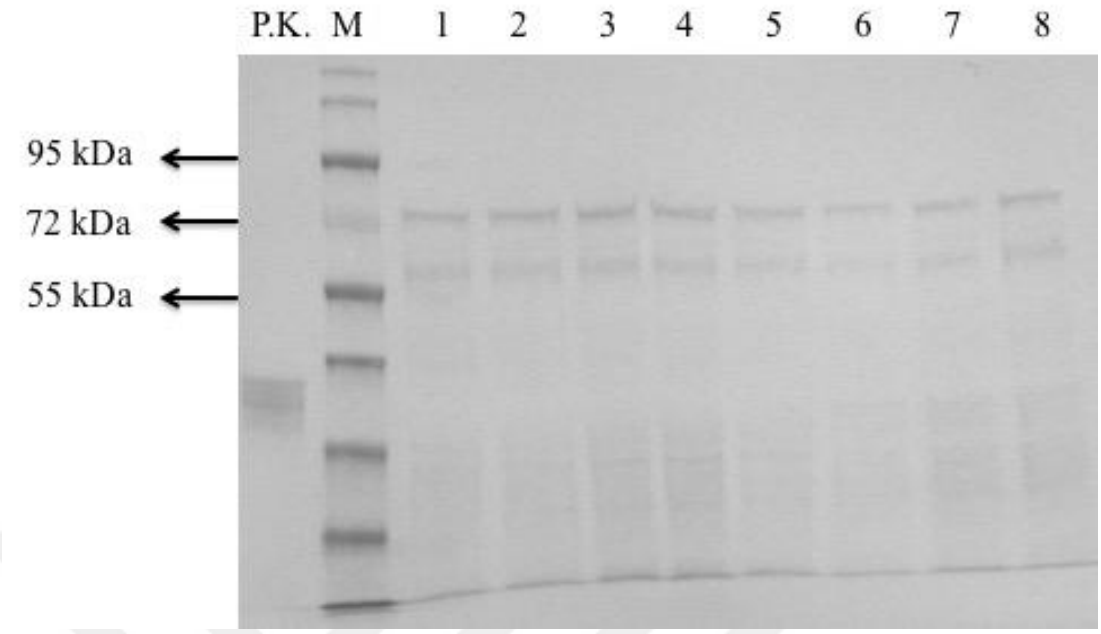
4.4.4.2. Western Blot Analizleri Sonuçları

SDS-PAGE analizlerinde her ne kadar hedef bantlar seçilebilse de jel üzerinde görülen non-spesifik bant yoğunluğundan dolayı ekspresyon optimizasyonlarının doğrulanmasına ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle hem 6xHis ile işaretli BbigAMA-1 proteinin belirlenmesi hem de SDS-PAGE analizleriyle belirlenen ekspresyon optimizasyonunun konfirme edilmesi amacıyla Western Blot analizleri yapılmıştır.

In vivo BbigAMA-1'in farklı IPTG oranlarında yapılan indüklemelerinde 0-6. saatler arası alınan örneklerin Western Blot analizleri Fusion FX5 (Vilber Lourmat, Germany) ile görüntülenmiş ve analiz sonuç görüntülerinin bir kısmı Şekil 4.34 ve 4.35'de sunulmuştur.

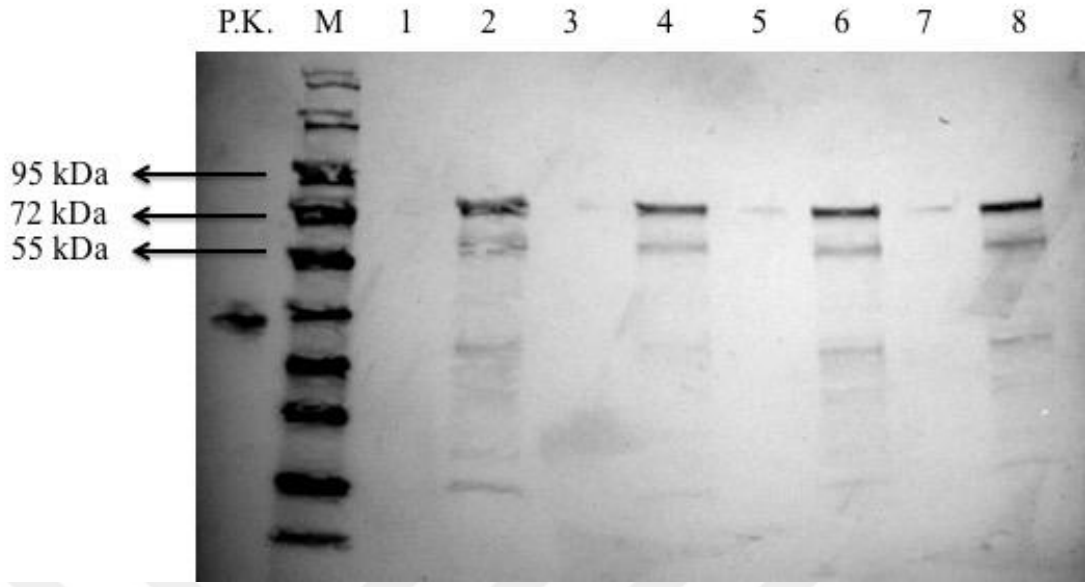


Şekil 4.34. *In vivo* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin Western Blot analizi görüntüsü. P.K.: Pozitif kontrol; M: Marker; 1: 0,1 mM IPTG indükleme, 2. saat; 2: 0,01 mM IPTG indükleme, 2. saat; 3: 0,001 mM IPTG indükleme, 2. saat; 4: 0,0001 mM IPTG indükleme, 2. saat; 5: 0,1 mM IPTG indükleme, 1. saat; 6: 0,01 mM IPTG indükleme, 1. saat; 7: 0,001 mM IPTG indükleme, 1. saat; 8: 0,0001 mM IPTG indükleme, 1. saat

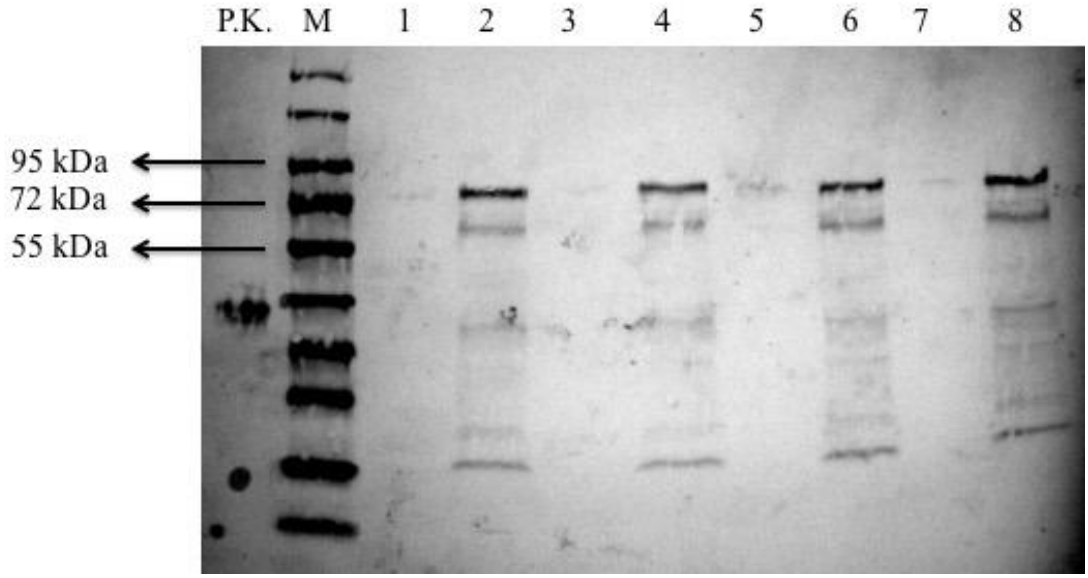


Şekil 4.35. *In vivo* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin Western Blot analizi görüntüsü. P.K.: Pozitif kontrol; M: Marker; 1: 0,001 mM IPTG indükleme, 5. saat; 2: 0,0001 mM IPTG indükleme, 5. saat; 3: 0,001 mM IPTG indükleme, 4. saat; 4: 0,0001 mM IPTG indükleme, 4. saat; 5: 0,1 mM IPTG indükleme, 3. saat; 6: 0,01 mM IPTG indükleme, 3. saat; 7: 0,001 mM IPTG indükleme, 3. saat; 8: 0,0001 mM IPTG indükleme, 3. saat

In vivo BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan Western Blot analizlerinin sonucunda en iyi ekspresyon seviyesinin 2. saatte olduğu belirlenmiştir. Ancak farklı IPTG oranlarının ekspresyon seviyelerinde belirgin bir farklılık görülmemesi üzerine ikinci bir Western Blot analizi yapılmış ve bu analizde sadece 2. saat dikkate alınmıştır. Böylece farklı IPTG oranlarına sahip örnekler 20 µl ve 1 µl olmak üzere jelde yan yana yüklenmiş ve ekspresyon seviyeleri karşılaştırmalı olarak kontrol edilmiştir. Analiz sonuçlarının görüntüleri Şekil 4.36 ve 4.37'de sunulmuştur.



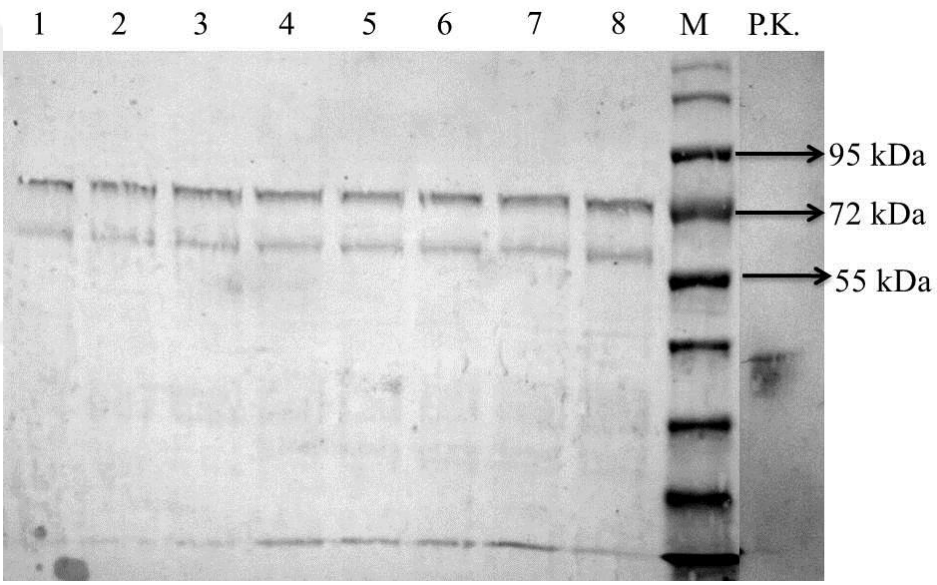
Şekil 4.36. *In vivo* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin 2. saate göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin 1-20 µl jel yüklemelerinin Western Blot analizi görüntüsü. P.K.: Pozitif kontrol; M: Marker; 1: 0,01 mM IPTG indükleme, 1 µl yükleme; 2: 0,01 mM IPTG indükleme, 20 µl yükleme; 3: 0,001 mM IPTG indükleme, 1 µl yükleme; 4: 0,001 mM IPTG indükleme, 20 µl yükleme; 5: 0,0001 mM IPTG indükleme, 1 µl yükleme; 6: 0,0001 mM IPTG indükleme, 20 µl yükleme; 7: 0,00001 mM IPTG indükleme, 1 µl yükleme; 8: 0,00001 mM IPTG indükleme, 20 µl yükleme



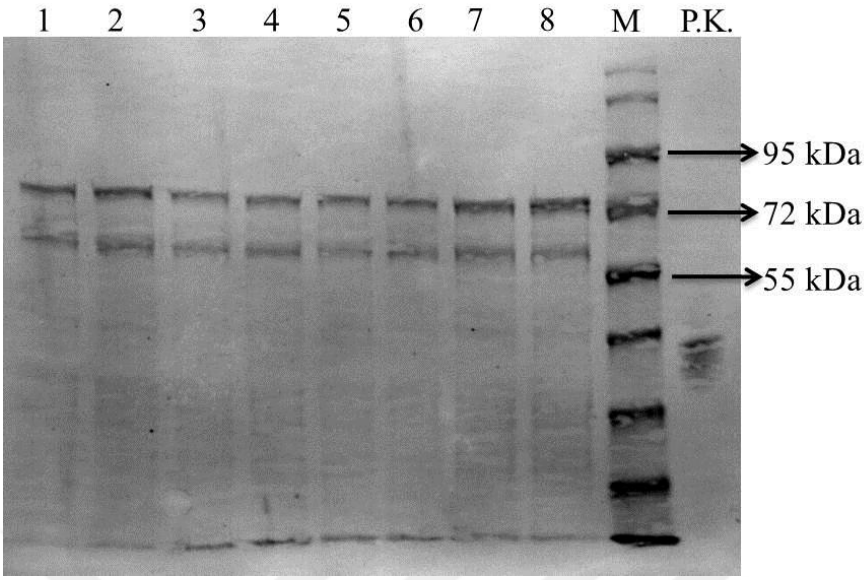
Şekil 4.37. *In vivo* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin 2. saate göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin 1-20 µl jel yüklemelerinin Western Blot analizi görüntüsü. P.K.: Pozitif kontrol; M: Marker; 1: 2 mM IPTG indükleme, 1 µl yükleme; 2: 2 mM IPTG indükleme, 20 µl yükleme; 3: 1 mM IPTG indükleme, 1 µl yükleme; 4: 1 mM IPTG indükleme, 20 µl yükleme; 5: 0,5 mM IPTG indükleme, 1 µl yükleme; 6: 0,5 mM IPTG indükleme, 20 µl yükleme; 7: 0,1 mM IPTG indükleme, 1 µl yükleme; 8: 0,1 mM IPTG indükleme, 20 µl yükleme

Şekil 4.36 ve 4.37'de sunulan Western Blot analizi sonuçlarına göre, 1 µl'lik yüklemeler incelendiğinde en iyi ekspresyonun 0,00001 mM IPTG indüklemesinde meydana geldiği görülmektedir. Böylece *in vivo* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmaları sonucunda optimum indükleme oranının 0,00001 mM IPTG ile olduğu anlaşılmış ve en iyi ekspresyonun 2. saatte gerçekleştiği belirlenmiştir.

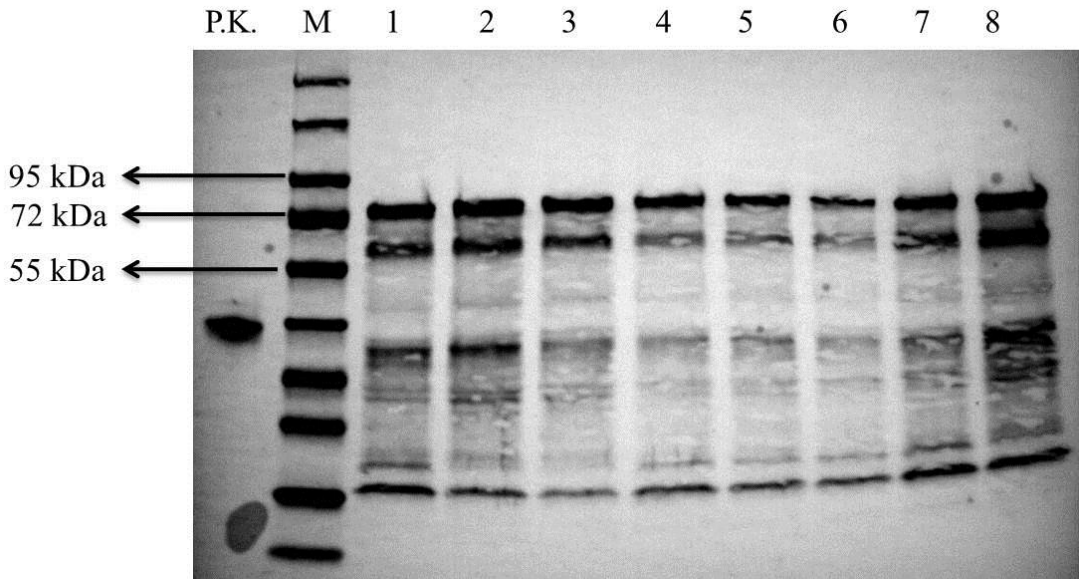
In vitro BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında ise yine farklı IPTG oranlarında yapılan indüklemelerde 0-6. saatler arası alınan örnekler Western Blot analizlerine tabii tutulmuş ve sonuçlar Fusion FX5 (Vilber Lourmat, Germany) ile görüntülenerek Şekil 4.38 ve 4.39, 4.40, 4.41 ve 4.42'de sunulmuştur.



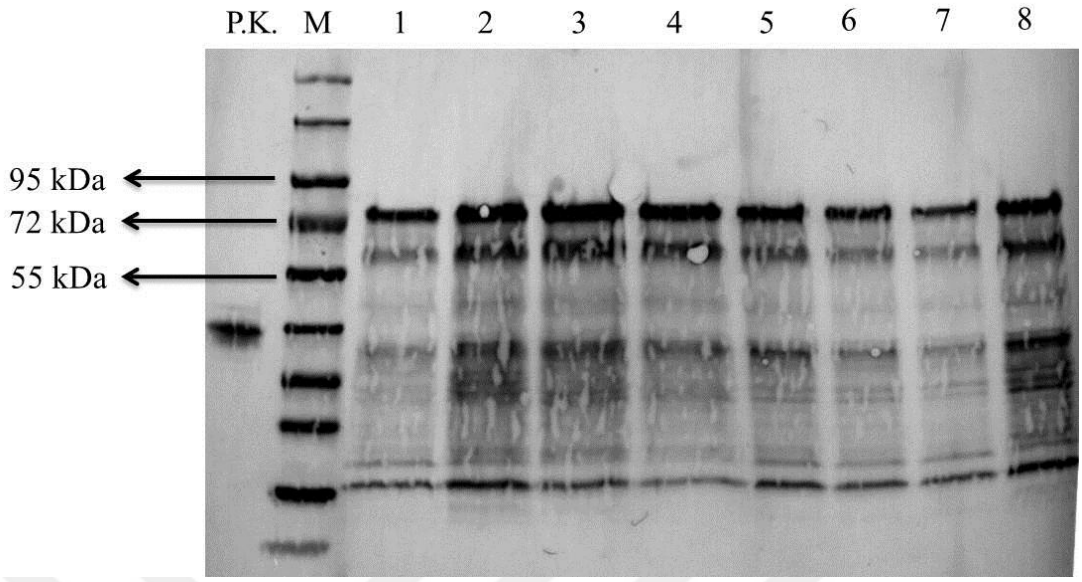
Şekil 4.38. *In vitro* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin Western Blot analizi görüntüsü. 1: 0,0001 mM IPTG indükleme, 1. saat; 2: 0,001 mM IPTG indükleme, 1. saat; 3: 0,01 mM IPTG indükleme, 1. saat; 4: 0,1 mM IPTG indükleme, 1. saat; 5: 0,5 mM IPTG indükleme, 1. saat; 6: 1 mM IPTG indükleme, 1. saat; 7: 2 mM IPTG indükleme, 1. saat; 8: 0,0001 mM IPTG indükleme, 2. saat; M: Marker; P.K.: Pozitif kontrol



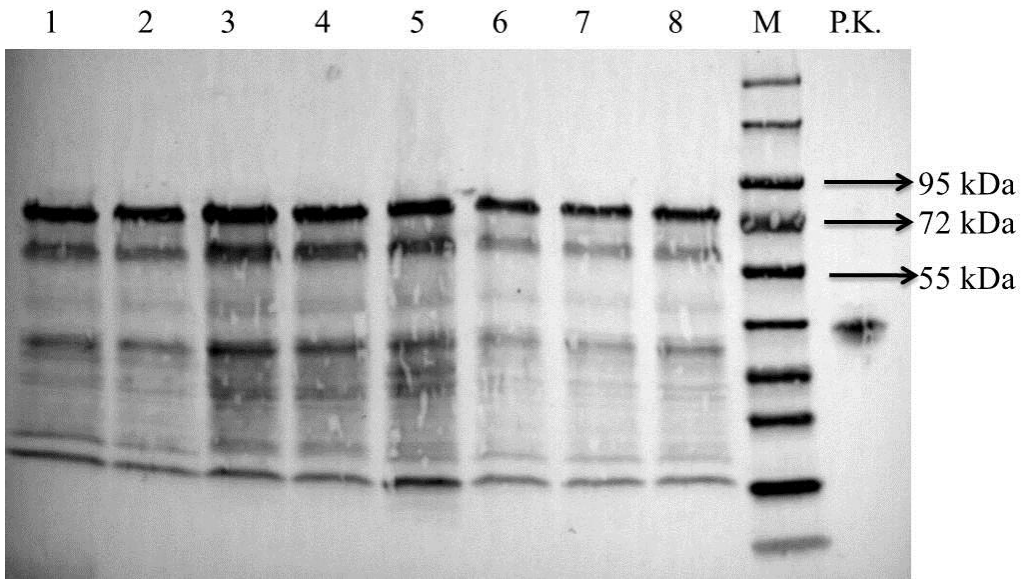
Şekil 4.39. *In vitro* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin Western Blot analizi görüntüsü. 1: 0,001 mM IPTG indükleme, 2. saat; 2: 0,01 mM IPTG indükleme, 2. saat; 3: 0,1 mM IPTG indükleme, 2. saat; 4: 0,5 mM IPTG indükleme, 2. saat; 5: 1 mM IPTG indükleme, 2. saat; 6: 2 mM IPTG indükleme, 2. saat; 7: 0,0001 mM IPTG indükleme, 3. saat; 8: 0,001 mM IPTG indükleme, 3. saat; M: Marker; P.K.: Pozitif kontrol



Şekil 4.40. *In vitro* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin Western Blot analizi görüntüsü. P.K.: Pozitif kontrol; M: Marker; 1: 0,1 mM IPTG indükleme, 4. saat; 2: 0,001 mM IPTG indükleme, 4. saat; 3: 0,0001 mM IPTG indükleme, 4. saat; 4: 2 mM IPTG indükleme, 3. saat; 5: 1 mM IPTG indükleme, 3. saat; 6: 0,5 mM IPTG indükleme, 3. saat; 7: 0,1 mM IPTG indükleme, 3. saat; 8: 0,01 mM IPTG indükleme, 3. saat



Şekil 4.41. *In vitro* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin Western Blot analizi görüntüsü. P.K.: Pozitif kontrol; M: Marker; 1: 0,1 mM IPTG indükleme, 5. saat; 2: 0,01 mM IPTG indükleme, 5. saat; 3: 0,001 mM IPTG indükleme, 5. saat; 4: 0,0001 mM IPTG indükleme, 5. saat; 5: 2 mM IPTG indükleme, 4. saat; 6: 1 mM IPTG indükleme, 4. saat; 7: 0,5 mM IPTG indükleme, 4. saat; 8: 0,01 mM IPTG indükleme, 4. saat



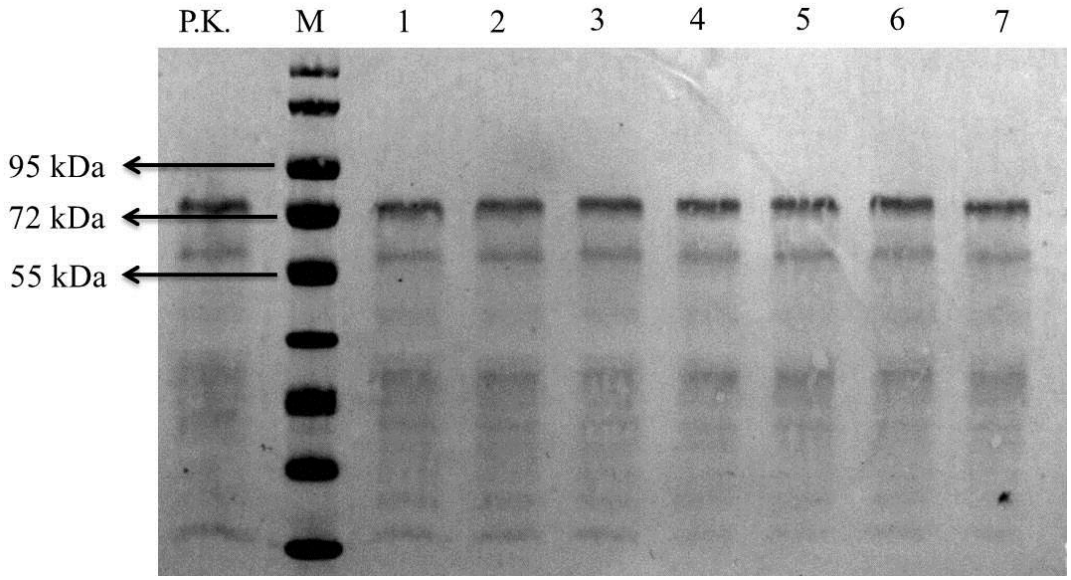
Şekil 4.42. *In vitro* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmalarında kullanılan farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin Western Blot analizi görüntüsü. 1: 0,5 mM IPTG indükleme, 5. saat; 2: 1 mM IPTG indükleme, 5. saat; 3: 0,0001 mM IPTG indükleme, 6. saat; 4: 0,001 mM IPTG indükleme, 6. saat; 5: 0,01 mM IPTG indükleme, 6. saat; 6: 0,1 mM IPTG indükleme, 6. saat; 7: 0,5 mM IPTG indükleme, 6. saat; 8: 1 mM IPTG indükleme, 6. saat; M: Marker; P.K.: Pozitif kontrol

Şekil 4.38 ve 4.39, 4.40, 4.41 ve 4.42'de sunulan Western Blot analizi sonuçları incelendiğinde en iyi ekspresyonun 0,01 mM IPTG indüklemesinde ve 5. saatte meydana geldiği görülmüştür.

In vivo ve *in vitro* BbigAMA-1'in pilot ekspresyon çalışmaları sonucunda optimum indükleme oranları ve en iyi ekspresyon saatleri belirlenmiş ve rekombinant proteinlerin saflaştırılması öncesinde daha büyük hacimde yapılan ekspresyon çalışmalarına geçilmiştir.

4.4.5. Ekspresyon Sonuçları

Pilot ekspresyon denemeleri sonucunda belirlenen optimum IPTG oranı ve indükleme saati, ekspresyon aşamalarında uygulanmıştır. Daha önce *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transformasyonu sağlanan rekombinant plazmidler daha büyük hacimde (50 ml) eksprese edilmiştir. Rekombinant BbigAMA-1 proteinlerinin saflaştırılması işlemi öncesinde kontrol amaçlı alınan (1 ml) eksprese edilmiş *in vivo* ve *in vitro* BbigAMA-1 proteinleri Western Blot işlemine tabii tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.43'te sunulmuştur.



Şekil 4.43. Ekspresyon sonrası *in vivo* ve *in vitro* BbigAMA-1 proteinlerinin kontrolü. P.K.:Pozitif kontrol; M: Marker; 1,2,3: *in vivo* BbigAMA-1 ekspresyonu; 4,5,6,7: *in vitro* BbigAMA-1 ekspresyonu

Şekil 4.43'de sunulduğu gibi BbigAMA-1 proteininin her iki suş için de başarılı bir şekilde eksprese olduğu belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra büyük hacimde üretimi

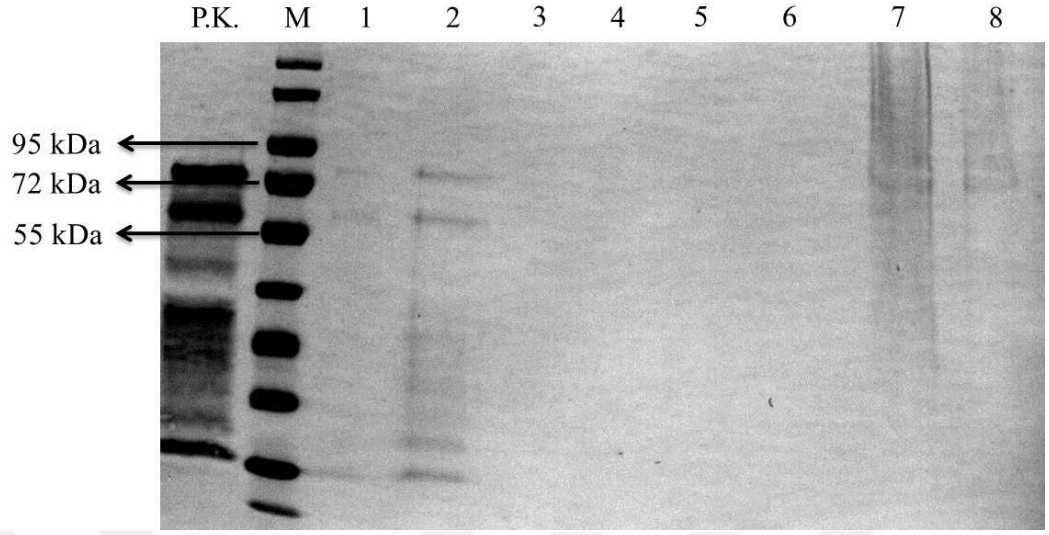
yapılan ve santrifüj edilen örneklerden rekombinant protein saflaştırılmasına geçilmiştir.

4.5. REKOMBİNANT BBIGAMA-1 PROTEİNLERİNİN SAFLAŞTIRMA SONUÇLARI

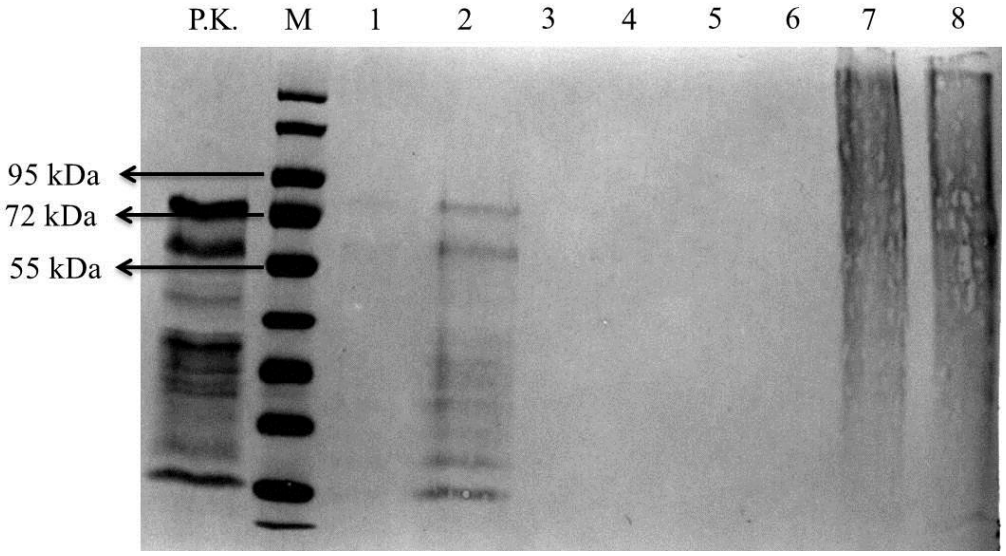
BbigAMA-1 proteinleri rekombinant olarak üretildikten sonra protein üretim bakterisi olarak kullanılan *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinden total protein izolasyonu yapılmıştır. Üretilen rekombinant proteinler N-terminal kısmında 6xHis ile işaretli olduğundan saflaştırılma denature kondisyonda histidin'e afinite gösteren Nickel-Chelating Resin kullanılarak yapılmıştır.

Saflaştırma basamaklarında olası protein kayıplarını tespit etmek amacıyla "bakteriyel hücre lizatlarının hazırlanması" ve "denature kondisyonda protein pürifikasyonu" basamaklarında örnekler alınmış ve daha sonra bu örnekler Western Blot analizlerine tabii tutulmuştur.

Saflaştırma sonrasında elde edilen proteinlerin konsantrasyonu *in vivo* BbigAMA-1 için 149 µg/ml, *in vitro* BbigAMA-1 için ise 184 µg/ml olarak ölçülmüştür. Saflaştırılan rekombinant proteinlerin BbigAMA-1 olup olmadığı Western Blot analizleri sonucunda belirlenmiştir. Saflaştırma esnasında toplanan fraksiyonların ve elde edilen saf proteinlerin Western Blot analiz sonuçları Şekil 4.44 ve 4.45'de sunulmuştur.



Şekil 4.44. Saflaştırma esnasında toplanan fraksiyonlar ve elde edilen *in vivo* BbigAMA-1 saf proteininin Western Blot analizi. P.K.: Pozitif kontrol; M: Marker; 1: *in vivo* BbigAMA-1 saf protein (4 µl); 2: *in vivo* BbigAMA-1 saf protein (20 µl); 3: wash buffer (pH: 5,3) sonrası alınan supernatant; 4: wash buffer (pH: 6,0) sonrası alınan supernatant; 5: binding buffer sonrası alınan supernatant; 6: bakteriyal lizat-resin süspansiyonu sonrası alınan süpernatant; 7,8: lizis sonrası hücre lizatları



Şekil 4.45. Saflaştırma esnasında toplanan fraksiyonlar ve elde edilen *in vitro* BbigAMA-1 saf proteininin Western Blot analizi. P.K.: Pozitif kontrol; M: Marker; 1: *in vitro* BbigAMA-1 saf protein (4 µl); 2: *in vitro* BbigAMA-1 saf protein (20 µl); 3: wash buffer (pH: 5,3) sonrası alınan supernatant; 4: wash buffer (pH: 6,0) sonrası alınan supernatant; 5: binding buffer sonrası alınan supernatant; 6: bakteriyal lizat-resin süspansiyonu sonrası alınan süpernatant; 7,8: lizis sonrası hücre lizatları

Şekil 4.44 ve 4.45'e göre protein saflaştırma basamaklarında herhangi bir kaybın olmadığı ve basamakların hatasız bir şekilde uygulandığı görülmektedir. Her iki suş için elde edilen saf proteinlerin Western Blot analizi sonucu incelendiğinde ise 72 kDa olan esas protein bandının altında farklı kDa'larda fraksiyonların olduğu gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Apikompleksan protozoonlar, hücre invazyonu için gerekli olan ve birçok korunmuş mekanizmayı bünyelerinde barındıran salgı organellerinin, apikal bölgelerde ortak bir set halinde yer almalarından dolayı bu isimle tarif edilmektedirler. Bu organizmalar, hayat siklusların devam ettirebilmek için kritik öneme sahip olan konak hücre invazyonunu gerçekleştirmek zorundadırlar. Aynı zamanda bu invazyon, aralarında *Babesia* türlerinin de yer aldığı bu parazitlerin patogenezisinde de önemli bir rol oynamaktadır (41). *Babesia* türlerinin hayat siklusların tamamlayabilmeleri için en önemli faktörlerden biri olan eritrositleri bulma ve tutunma aşamasında rol oynayan moleküller hakkında edinilen bilgiler tam olarak yeterli bulunmamakta ve konu üzerinde çalışmalar halen devam etmektedir (340).

Babesia merozoitleri, konağın kırmızı kan hücrelerini bulma, tutunma ve invaze olma aşamasında eşsiz bir rol ve kabiliyete sahiptirler (384, 385). Merozoitlerin bu özelliğinin içerdikleri tamamlayıcı ligandların, konak eritrositlerinde yer alan özel reseptörleri tanımlamasından ileri geldiği ifade edilmektedir. Bu aşamada görev alan en önemli adhesinlerden biri AMA-1 proteinleridir (340). AMA-1, diğer apikompleksan homologlarında da yer alan bir tip 1 membran proteini ve ayrıca *P. knowlesi*'den identifiye edilmiş ilk merozoit yüzey antijenidir (326, 386). Parazitlerin yüzeyinde bulunan apikal salgı organelleri olarak bilinen mikronemlerden salgılanan AMA-1 proteinleri, konak hücre invazyonunda rol oynayan en önemli proteinlerden biri olarak ifade edilmektedirler (387, 388).

Apikompleksan parazit türleri incelendiğinde AMA-1'in hemen tüm türlerde korunmuş alanlara sahip olduğu görülmüştür (389). Bu korunmuş alanlar, söz konusu molekülün yapısında bulunan, protein veya karbonhidrat reseptörlerinin adhezyon fonksiyonunda görev alan ve PAN-folding motifler içeren cystine-rich ektodomainlerin varlığıyla ilişkilendirilmiştir (325, 390). AMA-1, korunmuş alanlara sahip olması, invazyonda önemli rol oynaması gibi taşıdığı özellikler nedeniyle apikompleksan parazitlerin meydana getirdiği hastalıklara karşı aşı geliştirme çalışmalarında da önemli bir hedef protein olabileceği ileri sürülmüştür (338, 339). Bu kapsamda yapılan çalışmalar, daha çok *Plasmodium* spp. kaynaklı enfeksiyonlar üzerine yoğunlaşmış olmakla beraber, son yıllarda diğer apikompleksan parazitlerin neden olduğu hastalıklarda da AMA-1 ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (192, 325, 391).

Deans et al. (326)'ın 1982 yılında ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, *in vitro* ortamda *P. knowlesi*'nin çoğalmasını engelleyecek monoklonal antikorlar araştırılmış ve ilk kez AMA-1, koruyucu potansiyel aşı antijeni olarak tanımlanmıştır. AMA-1'in *P. knowlesi*'de tanımlanmasıyla birlikte diğer *Plasmodium* türleri üzerinde de çalışmalara başlanmıştır. *Plasmodium fragile* (392), *Plasmodium chabaudi adami* (393-398), *Plasmodium vivax* (399), *Plasmodium yoelii yoelii* (400), *Plasmodium cynomolgi* (401), *Plasmodium falciparum* (324, 402, 403) türlerinde yapılan çalışmalarda AMA-1'in aseksüel gelişimlere yönelik etkileri test edilmiş ve çalışmalar sonucunda AMA-1, aşı çalışmaları için hedef protein olarak değerlendirilmiştir. Takiben, özellikle *P. falciparum* enfeksiyonları için AMA-1 tabanlı çok sayıda ticari aşı üretilmiş, insanlar üzerinde faz çalışmaları yapılmış ve aşılar Amerika Birleşik Devletleri, Birleşik Krallık, Mali, Hollanda, Çin ve İsviçre başta olmak üzere Dünya'nın çeşitli ülkelerinde kullanılmaya başlanmıştır (404).

AMA-1'in *Plasmodium* türlerinin yaşam döngüsündeki rolü ve önemi ortaya konduktan sonra çalışmalar, diğer apikompleksan parazit türleri üzerinde de devam etmiştir. AMA-1, *T. gondii*'de ilk kez 2000 yılında, Hehl et al. (329) yaptıkları bir çalışmayla araştırılmıştır. Takiben, yapılan çalışmalarda, AMA-1'in *T. gondii*'nin invazyonunda da kritik bir rol oynadığı tespit edilmiş ve diğer proteinlerle olan ilişkileri de göz önüne alınarak konuya derinlik kazandırılmıştır (331, 405-408).

Zhang et al. (409) fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, AMA-1, RON2 ve RON4 peptidlerini içeren T ve B hücre epitopları ile toxoplasmosis'e karşı intranasal immunizasyon oluşturmuşlar ve bu peptid kombinasyonunun koruyucu etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Böylece mukozal aşı stratejisi ile toxoplasmosis'e karşı koruma sağlanabileceğini ve gelecekte *Toxoplasma* aşı geliştirme çalışmalarında bu stratejinin uygulamada başarılı olabileceğini ortaya koymuşlardır. Öte yandan, filogenetik analizlerde, *T. gondii*'nin sister grubu olarak belirlenen, bir diğer apikompleksan protozoon parazit türü *Neospora caninum*'da da AMA-1 araştırmaları yapılmıştır (410-412). Zhang et al. (410) yaptıkları bir çalışmada, *N. caninum*'da AMA-1'in moleküler olarak karakterize etmişler ve sonrasında ekspresyon analizlerini yaparak elde ettikleri saflaştırılmış rekombinant proteinlerle fare immunizasyonlarını gerçekleştirmişlerdir. *In vitro* ortamda yaptıkları deney sonucu, immunizasyon sonrasında elde ettikleri antikorların, *N. caninum* ve *T. gondii* takizotlerinin konak hücre invazyonuna karşı etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Böylece AMA-1'in hem *N. caninum* hem de *T. gondii* için cross-reactive antijen olduğunu ve her iki türe karşı geliştirilebilecek bir potansiyel aşı adayı olabileceğini ortaya koymuşlardır.

Tavukçuluk sektöründe yıllık 1,5 milyar doları aşan ekonomik kayıplara yol açan coccidiosis'e karşı yapılan mücadele çalışmalarında, potansiyel rekombinant aşı üretimi için *Eimeria* spp. genleri klonlanmış ve enfeksiyonların kontrolü için alternatif stratejiler geliştirilmeye çalışılmıştır (413-416). Özellikle son yıllarda *Eimeria* türleri üzerinde yapılan genomik ve proteomik çalışmalarda AMA-1 ön plana çıkmış ve bu kapsamda yeni çalışmalar planlanmıştır (417). *Eimeria tenella*'nın yaşam siklusundaki formlarının (sporlanmamış ookist, sporlanmış ookist, sporozoit ve ikinci nesil merozoit) proteomik karşılaştırmaları amacıyla yapılan bir çalışmada, sporozoitlerde AMA-1 proteininin tespit edilmesinin ardından *E. maxima*'da da AMA-1 rapor edilmiş ve potansiyel aşı adayı olarak gösterilmiştir (418, 419). Takiben, Jiang et al'ın (417) yaptıkları bir çalışmada AMA-1, *E. tenella*'da klonlanıp sekanslanarak karakterize edilmiş ve ekspresyonu sağlanarak invazyondaki rolü açıklanmıştır. AMA-1, coccidiosis'e karşı DNA aşı adayı olarak da araştırılmış ve bu kapsamda Hoan et al. (420) yaptıkları bir araştırmada, *E.*

brunetti kaynaklı enfeksiyonlarda AMA-1'den dizayn edilmiş DNA aşısının koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

AMA-1, *Rhipicephalus appendiculatus* ile nakledilen, özellikle Doğu ve Güney Afrika'da yaşayan sığır ve Afrika bizonlarında lenfoproliferatif karakterli seyreden sığır theileriosis'ine [Doğu Sahil Humması (East Coast Fever)] sebep olan ve meydana gelen klinik semptomlar sonucunda büyük ekonomik kayıplara yol açan bir diğer apikompleksan parazit türü *Theileria parva*'da da araştırılmış ve karakterize edilmiştir (421). Yapılan çalışma sonucunda, AMA-1'in *T. parva* için de korunmuş bölgelere sahip olduğu belirlenmiş ve konak hücre invazyonunda önemli bir rol oynaması nedeniyle Doğu Sahil Humması Hastalığı'na karşı geliştirilebilecek aşılar için ideal bir hedef protein olabileceği bildirilmiştir (421).

Dünya'da en yaygın seyreden hastalıklardan biri olarak sınıflandırılan babesiosis, veteriner ve zoonotik önemi olan kene kaynaklı bir enfeksiyondur (43). Babesiosis'in neden olduğu büyük ekonomik kayıplar, bu hastalığa karşı mücadelede yeni yöntem ve stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Bu kapsamda en sık uygulanan mücadele yöntemi ilaç tedavisidir. Ancak son zamanlarda hastalık etkenlerinin kullanılan ilaçlara karşı direnç kazanması ve ilaçların sebep olduğu toksik etkiler nedeniyle daha kapsamlı çözüm yöntemleri aranmaya başlanmıştır. Bu mücadele yöntemlerinden biri de farklı üretim metotları kullanılarak geliştirilmiş olan aşılardır (185). Günümüzde babesiosis'den korunma amaçlı genellikle canlı veya inaktif aşılar kullanılmaktadır (185). Ancak, öldürülmüş veya zayıflatılmış etkenlerden veya çözünür *Babesia* antijenlerinden köken alan bu aşıların tam anlamıyla tatmin edici bir koruyuculuğunun olmadığı da belirtilmiştir (185, 339). Bu nedenle son zamanlarda özellikle invazyon esnasında kritik görevleri olan tanımlanmış antijenlerden aşı üretme çalışmalarına başlanmıştır (339). Özellikle *Plasmodium* türlerinde, aşı geliştirme çalışmalarında kullanılan ve sıtmaya karşı başarılı bir şekilde mücadele edilmesine olanak sağlayan AMA-1 aşılarından esinlenerek ve diğer bazı apikompleksan parazitlerde olduğu gibi *Babesia* türlerinde de AMA-1 proteini üzerine çalışılmaya başlanmıştır (325, 337-339).

Gaffar et al. (192), 2004 yılında yaptıkları bir çalışmayla *B. bovis*'den ilk kez izole ettikleri AMA-1'i klonlayıp karakterize etmişler ve *P. falciparum*'dan izole edilen

AMA-1 ile aralarındaki karakteristik yapıların benzerliğini araştırmışlardır. Aynı araştırıcılar, çalışmalarından elde ettikleri rekombinant saf AMA-1 proteinleriyle tavşanlarda immunizasyon oluşturmuşlar ve elde ettikleri antikorlar ile *in vitro* ortamda immunfloresan mikroskop ile AMA-1'in konak hücreye invazyonda etkinliğini görüntülemişlerdir. *In vitro* ortamda yapılan bu çalışmalar sonucunda; AMA-1'e karşı elde edilmiş antikorların, *B. bovis* serbest merozoitlerinin invazyon etkinliğini düşürdüğü ve %65 oranında bir koruma sağladığı tespit edilmiş ve saha şartlarında sığırlar üzerinde yapılacak genetik çalışmalar sonrasında bu proteinin potansiyel bir aşı komponenti olabileceği ileri sürülmüştür (192). Daha sonra, Salama et al. (339) *B. bovis* AMA-1'in ektodomain I ve II bölgesinin oldukça korunmuş olduğunu belirlemişler ve bu doğrultuda söz konusu bölgelerden ürettikleri rekombinant saf AMA-1 proteinleri fareler üzerinde çalışarak bu proteine karşı spesifik antikor elde etmişlerdir. *In vitro* ortamda gerçekleştirdikleri deneyler sonucunda elde ettikleri bu antikorların, *B. bovis* merozoitlerinin konak hücreye invazyonlarını %61-70 oranında engellediklerini tespit etmişlerdir. Aynı araştırıcılar (339), elde ettikleri bu sonuçlar doğrultusunda, AMA-1'in babesiosis için geliştirilecek aşılar için ideal bir hedef protein olabileceğini ve çalışmaların diğer *Babesia* türleri için de denenmesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir.

AMA-1'in *B. bovis*'te karakterize edilmesinin ardından Zhou et al. (422) bu proteini *B. gibsoni'*de çalışarak karakterize etmişler ve *B. gibsoni*'den izole ettikleri rekombinant saf AMA-1 protein antijenlerini, *B. gibsoni* ile deneysel enfekte edilen köpeklerden post-enfeksiyonun 15. ve 30. günlerinde alınan immun serumlarda antikor varlığını araştırmak için Western Blot ve ELISA testlerine tabii tutmuşlar ve böylece AMA-1'in teşhis için güvenilir bir protein olup olmadığını araştırmışlardır. Araştırıcılar (422), çalışmalarının sonucunda AMA-1'in kronik enfeksiyonlarda (30. gün) başarılı bir teşhis antijeni olduğunu ancak erken enfeksiyonlar için (15. gün) aynı başarıyı gösteremediğini saptamışlardır. Bunun yanında aynı araştırıcılar (422), *B. gibsoni*'den izole edilen AMA-1'in biyolojik fonksiyonunun ortaya konularak aşı çalışmaları için hedef protein adayı olarak araştırılması gerektiğini de bildirmişlerdir.

Montero et al. (340) AMA-1'i *B. divergens*'de çalışmışlardır. Bu çalışmada araştırıcılar, *B. divergens*'ten izole ettikleri AMA-1'i detaylı bir şekilde karakterize

etmişler ve *in vitro* hücre kültüründen izole ettikleri doğal *B. divergens* hücrelerinin invazyondaki etkilerini immuno-elektron mikroskobik görüntüler ile araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, deney hayvanı immunizasyonu ile elde edilen antikorların, *B. divergens* merozoitlerinin invazyonunu yaklaşık %50 oranında engellediği tespit edilmiştir. Araştırıcılar (340), bu sonuçlar doğrultusunda, *B. divergens*'in etken olduğu babesiosis vakalarına karşı immuno-terapotik ilaç uygulamalarının geliştirilmesinde, AMA-1'in önemli bir rol oynayabileceğini bildirmişlerdir. Takiben, Moreau et al. (338) da AMA-1'i *B. divergens*'de çalışmışlar ve koyunlarda *B. divergens* AMA-1'e karşı meydana gelen humoral immun yanıt mekanizmalarını incelemişler ve AMA-1'in aşı olarak kullanıldığı doğal enfeksiyonlarda, enfeksiyonun başlangıç aşamasında etkenin invazyon sürecini bloklayarak hastalığın kontrol altına alınmasında önemli bir rol oynadığını buna karşın sonraki evrelerde çok etkin bir koruma sağlamadığını tespit etmişlerdir.

AMA-1 birçok *Babesia* türünde olduğu gibi *B. orientalis*'te de çalışılmıştır. He et al. (337) *B. orientalis*'ten identifiye ettikleri AMA-1'in moleküler karakterizasyonunu yaparak ekspresyon analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Takiben, elde ettikleri rekombinant saf AMA-1 proteiniyle deney hayvanlarında immunizasyon oluşturmuşlar ve antijene spesifik antikorlar elde ederek bunların immunoblotting analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Araştırıcılar, bu çalışmalarının sonucunda, AMA-1'in *B. orientalis* için serolojik teşhiste kullanılabilecek bir antijen olduğunu ve sahip olduğu korunmuş alanlar sayesinde aşı çalışmaları için hedef protein olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Öte yandan, Moitra et al. (423), AMA-1'i insanlarda babesiosis'in etkeni *B. microti*'de çalışmışlar ve AMA-1'in gen klonlamasını, rekombinant ekspresyonunu ve genetik-biyolojik karakteristiğini ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte aynı araştırıcılar (423), immunizasyon oluşturdukları farelerden izole ettikleri AMA-1 antikorlarının *in vitro* ortamda *B. microti* hücrelerinin invazyonlarını engelleyerek parazitin çoğalmasını 24 saat içinde %80 oranında inhibe edebildiklerini tespit etmişler ve böylece AMA-1'in babesiosis için beşeri alanda da aşı üretim kapsamında değerlendirilmesi gereken bir hedef protein olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Babesia bigemina diğer *Babesia* türlerinde olduğu gibi Dünya'nın tropik ve subtropik ülkelerinde seyreden ve özellikle et ve/veya süt üretimine dayalı sığır işletmelerinde büyük ekonomik kayıplara yol açan bir protozoondur (43, 424). Günümüzde, *B. bigemina*'nın etkeni olduğu babesiosis için genellikle attenüe suşlar aşı olarak kullanılmaktadır. Ancak bu suşlar ile aşılanan hayvanlar, vahşi suşlara karşı direnç gösterememekte ve dolayısıyla üretilen bu aşılar yeterli koruyuculuğu sağlayamamaktadır. Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalarda *B. bigemina*'nın yüzey proteinlerinin moleküler ve immunolojik yapıları identifiye edilmeye başlanmıştır. Böylece bu proteinlerden üretilebilecek ve babesiosis'e karşı etkin koruma sağlayabilecek rekombinant aşı adayı hedef proteinleri belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla yapılan araştırmalar kapsamında gerek invazyonda oynadığı kilit rol, gerekse içerdiği korunmuş bölgeler nedeniyle diğer *Babesia* türlerinde olduğu gibi *B. bigemina* için de AMA-1 ön plana çıkmıştır.

Babesia bigemina'da AMA-1 ile ilgili oldukça az sayıda çalışma yapılmıştır. Torina et al. (193) ilk defa AMA-1 genini İtalyan suşlarında moleküler tabanlı araştırmışlar ve çeşitli biyoinformatik araçları kullanarak proteinsel yapıyı ortaya koymaya çalışmışlardır. Takiben Torina et al. (425) AMA-1'i *B. bigemina*'nın diagnostik testler için uygun bir antijen olup olmadığını araştırmış ve bu amaçla AMA-1'i prokaryotik ekspresyon sistemini kullanarak eksprese etmişlerdir. Böylece yeni ve kullanışlı bir ELISA tanı testi geliştirmeye çalışmışlardır. Bu iki çalışma dışında mevcut veri tabanları taramalarında *B. bigemena*'da AMA-1'in araştırıldığına dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda apikompleksan parazit türlerinin hayat sikluslarında önemli bir rol oynaması, hemen hemen tüm apikompleksan parazit türlerinde rekombinant aşı üretimi için ideal bir hedef protein olarak gösterilmesine karşın bu noktada *B. bigemina* için yeterli açıklayıcı bilginin bulunmaması, moleküler ve immunolojik karakterizasyona ihtiyaç duyulması, *in vivo* ve *in vitro* kultivasyon sonucu oluşan attenüasyonun antijenik polimorfizime etkisinin ortaya konması için AMA-1 proteini seçilmiş ve kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır.

AMA-1 geninin moleküler analizleri, birçok apikompleksan parazit türlerinde araştırılmış ve ilgili genin karakterizasyonları ortaya konmuştur. AMA-1 geninin

moleküler karakterizasyonları, *T. gondii* ve *N. caninum*'dan ekstrakte edilmiş gDNA'larda çalışılmış ve araştırmalar sonucunda, AMA-1 nükleotid dizilimlerinin yapılarında intronlar olduğu rapor edilmiştir (329, 410). Ancak ilginç olarak, *Babesia* soyunda bulunan türler üzerinde yapılan AMA-1 çalışmalarında, nükleotid dizilimlerinde hiç bir intronun bulunmadığı tespit edilmiştir (337, 340, 422). Çalışmamızda, *B. bigemina* Kayseri/Turkey *in vivo* ve *in vitro* suşları, AMA-1 gen bölgelerini kodlayan nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi, belirlenen nükleotid dizilimlerinin intron içerip içermediğinin tespiti amacıyla gDNA izolasyonuna tabii tutulmuş ve ardından elde edilen gDNA'lar AMA-1 geninin tamamını amplifiye eden spesifik primerler ile PCR işlemine tabii tutularak klonlanmıştır. Klonlama sonucu elde edilen rekombinant plazmidler sekanslanmış ve her iki *B. bigemina* suşu için de AMA-1 geninin nükleotid dizilimleri elde edilmiştir. Nükleotid dizilimlerinin biyoinformatik programlarla analizleri sonucunda, *B. bigemina* için AMA-1 geninin, diğer tüm *Babesia* türlerinde olduğu gibi herhangi bir intron içermediği tespit edilmiştir.

AMA-1, birçok çalışmada, apikompleksan parazitlerin sebep olduğu hastalıklara karşı rekombinant aşı araştırma ve geliştirme çalışmaları için ideal bir hedef protein olarak belirlenmiş ve yine birçok rekombinant aşıda temel protein olarak görev almıştır (337, 339, 404, 410, 411, 421). Ancak bazı araştırıcılar, AMA-1'in yapısında yüksek derecede polimorfizm şekillenebileceğini ve dolayısıyla bu polimorfizmin AMA-1 tabanlı aşıların geliştirilmesine engel olabileceğini savunmaktadırlar (426, 427). *Plasmodium falciparum* üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda, AMA-1'in yapısında bulunan amino asit kalıntılarının yaklaşık %10'unun polimorfik yapıda olduğunu ve 200'ün üzerinde haplotipinin bulunduğu belirtilmiştir (366, 428). Ayrıca *P. vivax*'ın Brezilya suşlarında 13, Sri Lanka suşlarında ise 34 polimorfik alan olduğu da farklı çalışmalarda rapor edilmiştir (429, 430). Moreau et al. (338) ise Fransa'nın 7 farklı bölgesinde, insan ve sığırlardan izole ettikleri 9 adet *B. divergens* izolatının AMA-1 genlerini sekanslamışlar ve elde ettikleri sekansları karşılaştırarak suşlar arası bir polimorfizm olup olmadığını araştırmışlardır. Araştırıcılar elde ettikleri sekanslarda 2 adet mutajenik bölge olduğunu saptamışlardır. Yine Torina et al. (193) *B. bigemina* için yaptıkları bir araştırmada çalıştıkları 3 farklı suşta 32-54 adet mutasyon noktasının olduğunu saptamışlardır. Araştırıcıların sonuçları

incelendiğinde mutasyonların meydana geldiği bazların AMA-1'in domain I ve II'sinde olduğu bu nedenle söz konusu bölgelerde yüksek derecede polimorfizmler olabileceği anlaşılmaktadır (193, 338). Diğer taraftan, Chesne-Seck et al. (366) yaptıkları çalışmada, AMA-1'in domain III yapısının konak hücre invazyonu esnasında parazitin yüzeyinde bulunması ve bağlanmalarda farklılıklar göstermesi nedeniyle *Babesia, Plasmodium, Toxoplasma, Eimeria* ve *Neospora* soylarında değişken bir yapıda olduğu bildirilmiştir. Ancak bu yapının, *Babesia* türlerinin 4 cystine içermesi nedeniyle, tür içi korunmuş bölgelere sahip olduğu da Zhou et al. (422) tarafından rapor edilmiştir.

Çalışmamızda, BbigAMA-1 izolatlarının nükleotid ve amino asit dizilimlerinin polimorfik alanları hesaplanmış ve haplotip sayıları ilgili yazılımlar kullanılarak ortaya konmuştur. Nükleotid dizilimlerinin analizleri sonucunda, bu dizilimler arasında 21 farklı haplotipi ortaya koyan 448 polimorfik alan olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kapsamında, analize dahil edilen ve BbigAMA-1'in tamamının dizilimlerini içeren *B. bigemina* türlerinde tür içi bir çok polimorfik alan olduğu görülmüştür. Ancak, nükleotid dizilimlerinde görülen bu farklılıklar, amino asit dizilimlerinde az sayıda mutasyon bölgelerinin oluşmasına sebep olmuştur. Başka bir ifadeyle, söz konusu polimorfik alanların çok azının protein yapılarında mutasyonlara yol açtığı belirlenmiştir. Araştırmamızın materyalini oluşturan *B. bigemina*'nın *in vivo* ve *in vitro* suşlarından elde edilen izolatların nükleotid sekans dizilimleri karşılaştırıldığında ise bu iki izolatın ayrı birer haplotip oldukları, 4 adet polimorfik alan içerdikleri ve kendi aralarında %99,776 oranında identiklik gösterdikleri tespit edilmiştir. Aynı izolatların amino asit dizilimleri karşılaştırıldığında bu oran %99,832 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.10'da da verildiği üzere iki izolatın amino asit dizilimlerindeki farklılık Kayseri/Turkey IV1'de Phe^{35}'de Kayseri/Turkey IT2'de ise Leu^{35}'de görülmektedir. Bu farklılık nükleotid sekans dizilimlerinin 103. nükleotidlerindeki mutasyondan ileri gelmektedir. Amino asit dizilimlerindeki mutasyonun 35. amino asitlerde görülmesi dolayısıyla polimorfizimin Montero et al. (340)'ın tarif ettiğine göre domain I'de olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla elde edilen bu sonuçların, Moreau et al. (338) ve Torina et al. (193)'ın sundukları verilerle paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan, Şekil 4.18 ve 4.19'da görüleceği üzere her iki suş için de mutasyona uğradığı tespit edilen

35. amino asit, tahmini antijenik bölgede ve ekstrasellüler domainde yer almaktadır. Böylece, *in vivo* ve *in vitro* suşların BbigAMA-1 proteinlerindeki mutasyonun antijenik bölgeyi etkilediği görülmüştür. DNA aşı üretim çalışmalarında, parazit proteinlerinin antijenik bölgelerinin kombinasyonunun aynı veya daha güçlü bir koruma için gerekli olduğu rapor edilmiştir (431). Bu nedenle protein yapılarındaki antijenik bölgeler büyük önem arz etmektedir. Dolayısıyla çalışmamızda tespit edilen bu mutasyon, aynı tür parazite ait *in vivo* ve *in vitro* pasajlanmış bu iki suşun, DNA tabanlı olarak dizayn edilecek aşılarda farklı koruyucu etkiler yapabileceğini düşündürmüştür. Bunun yanında tespit edilen mutasyonun antijenik bölgede olması, her iki suşun farklı patojenik etkilere sahip olabileceği ihtimalini göz önüne koymaktadır. Nitekim aynı patojen türünün *in vivo* ve *in vitro* suşları üzerinde yapılan çalışmalarda bu farklılıklar rapor edilmiştir (432-435). Ancak kesin bir sonuca ulaşabilmek için devamlılık gösteren kültivasyonlar ile deneysel çalışmaların yapılması ve elde edilen immunolojik sonuçların flow cytometrik teknikler kullanılarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

Geçmişten günümüze, heterolog proteinlerin üretimi çalışmalarında birçok yöntem denenmiş ve kullanılmıştır. Bu yöntemler arasında, gram-negatif bir bakteri olan *E. coli*, pahalı olmayan uygun medyumlarda yüksek yoğunlukta hızlı üreme kabiliyetine sahip olması, genetik karakterizasyonunun kolay ve ulaşılabilir bir şekilde ortaya konmuş olması ve çok sayıda mutant konak suşlarının ve klonlama vektörlerinin uygun bir şekilde kullanımına olanak sağlaması açısından rekombinant protein üretiminde kullanılan en uygun ve ekonomik konaklardan biri olarak belirlenmiştir (436-438). Ancak bu özelliklerine rağmen *E. coli*, her ökaryatik protein veya her gen için yüksek oranda ve fonksiyonel bir şekilde ekspresyonun gerçekleşmesi için tek başına yeterli değildir. Etkin bir protein ekspresyonun gerçekleşebilmesi ve yüksek oranda protein üretimi elde edilebilmesi için protein gen diziliminin yapısal karakteristiği, mRNA'nın stabilitesi ve translasyon etkinliği, hedef proteinin konak hücre proteazları ile degradasyonu ve konak hücreye karşı kodon kullanımı toksisitesi bilinmeli ve proteinin kolay katlanabilir yapıya sahip olması gereklidir. Bu nedenle heterolog proteinlerin *E. coli*'de üretilebilmesi ve tekniklerin optimizasyonu için öncesinde bu bilinmeyen ökaryotik proteinlerin yapılarının iyi bir şekilde araştırılması gerekmektedir (438, 439).

Çalışmamızda, *B. bigemina* Kayseri/Turkey *in vivo* ve *in vitro* suşlarında izole edilen BbigAMA-1 geninin moleküler karakterizasyonu yapılmış ve tüm gene ait nükleotid dizilimleri eksiksiz bir şekilde elde edilmiştir. Elde edilen dizilimler, başlangıç ve bitiş kodonlarının belirlenebilmesi ve eksprese edilecek fragmentin tayini için açık okuma çerçevesi analizlerine tabii tutulmuştur. AMA-1 proteini daha önceki bir çalışmada (193), *B. bigemina*'da karakterize edilmesine rağmen, çalışmanın yapıldığı tarihte söz konusu protein ile ilgili henüz bir ekspresyon çalışması bulunmadığından, araştırmamızda pilot ekspresyon denemeleri yapılmıştır. Bu kapsamda, ekspresyon vektörüne klonlanan ve *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transferi gerçekleştirilen proteinler, özellikle konak hücre proteazları ile degradasyonlarının tespit edilebilmesi, konak hücreye karşı kodon kullanımı toksisitelerinin belirlenebilmesi ve etkin bir ekspresyonun gerçekleştirilebilmesi için farklı IPTG indükleme oranlarına maruz bırakılmış ve belirli saat aralıklarında indüklenmiş besi yerlerinden örnekler alınmıştır. Analiz sonuçlarına göre 37 °C'de gerçekleştirilen ekspresyonlarda *in vivo* BbigAMA-1 proteinleri için ideal ekspresyonun 0,00001 mM IPTG indüklemesiyle 2. saatte gerçekleştiği tespit edilmiştir. *In vitro* BbigAMA-1 proteinlerinin ise, 0,01 mM IPTG indüklemesiyle 5. saatte en iyi ekspresyon seviyesine ulaştığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Western Blot analizleriyle de konfirme edilmiştir. Konuyla ilgili yapılan araştırmalarda, yukarıda da açıklandığı üzere hedef protein yapısı da dahil olmak üzere bir çok faktörün etkin ekspresyon zamanına etki ettiği rapor edilmiştir (438-440). Ofran and Margalit (441), yaptıkları bir araştırmada, farklı nükleotid sekanslarına sahip ancak benzer amino asit dizilimleri gösteren proteinlerin yine benzer katlanmalar yaptıklarını bildirmişler ve bu nedenle, protein katlanmalarında asıl önemli rolün amino asit dizilimlerindeki zincirler arası etkileşimlerden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızdaki aynı tür parazite ait bu iki farklı suşun, amino asit dizilimlerinde meydana gelen mutasyon nedeniyle BbigAMA-1 proteinlerinin katlanma yerlerinde değişikliklerin oluştuğu ve bu nedenle de farklı IPTG konsantrasyonlarında ve yine farklı zaman aralıklarında eksprese oldukları düşünülmektedir.

Günümüzde çeşitli biyoinformatik araçlar ve yazılımlar araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Birçok analizin gerçekleşmesinde kolaylık sağlayan bu yazılımlar genellikle tahmini sonuçlar vermektedir. Torina et al. (193) bir çalışmalarında, *B.*

bigemina ile doğal enfeksiyon oluşturdukları sığırlardan elde ettikleri (kandan 2 adet, dalaktan 1 adet) örneklerin DNA ekstraksiyonunu takiben elde ettikleri gDNA'ların, AMA-1 genini amplifiye eden spesifik primerler ile PCR analizlerini yapmışlardır. Klonladıkları amplikonlardan elde ettikleri BbigAMA-1 nükleotid ve amino asit dizilerini, biyoinformatik yazılımları kullanarak, çeşitli *in silico* analizlere tabii tutmuşlardır. Araştırıcılar, yaptıkları *in silico* analizlerinin sonucunda, *B. bigemina*'da AMA-1'in moleküler ağırlığını 65,9 kDa olarak hesaplamışlardır. Çalışmamızda, SDS PAGE ve Western Blot analizleri öncesinde elde edilecek olan rekombinant proteinlerin tahmini moleküler ağırlıklarını hesaplamak ve hedef bölgede analiz sonuçlarını değerlendirebilmek amacıyla her iki izolat için mevcut amino asit dizilimleri ExPASy programı ile işleme tabii tutulmuştur. Yapılan *in silico* analizler sonucunda, Kayseri/Turkey IV1 için tahmini moleküler ağırlık 65,90938 kDa olarak Kayseri/Turkey IT2 için ise 65,87536 kDA olarak hesaplanmıştır. Ancak, BbigAMA-1'in rekombinant protein pürifikasyonu sonrasında yapılan Western Blot analizleri sonucunda BbigAMA-1'in moleküler ağırlığının her iki suş için de 72 kDa olduğu görülmüştür. Nitekim Gaffar et al. (192) *B. bovis*'te yaptıkları bir çalışmada, AMA-1'in moleküler ağırlığını *in silico* analizlerde 65 kDa olarak hesaplamalarına rağmen, ekspresyon analizleri sonucunda bu değerin 80 kDa olduğu rapor etmişlerdir. Elde edilen bu sonuçlar, biyoinformatik araçlar kullanılarak yapılan *in silico* analizlerin her zaman gerçeği yansıtmadığını göstermiştir. Böylece, *in silico* analizler sonrasında elde edilen sonuçların, çeşitli teknikler kullanılarak mutlaka doğrulanması gerektiği de anlaşılmıştır.

Çalışmamızda, rekombinant protein saflaştırma işlemleri sonrasında her iki suş için ayrı ayrı elde ettiğimiz saf BbigAMA-1 proteinleri, Western Blot analizlerine tabii tutulmuş ve Şekil 4.44 ve 4.45'de de görüleceği üzere 72 kDa olarak hesaplanan bant profillerinin altında silik de olsa başka bant profillerinin olduğu görülmüştür. Benzer sonuçlar Montero et al. (340) ve Howell et al. (442)'ın sırasıyla *B. divergens* ve *P. falciparum* üzerinde yaptıkları çalışmalarında da rapor edilmiştir. Aynı araştırıcılar (340, 442), bu durumun AMA-1'in proteolize uğramasından ve dolayısıyla peptidlerin serbest kalmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, AMA-1'in işlenmiş formlarının bu tip bant oluşumlarına yol açabileceği de ifade edilmiştir.

Akut babesiosis vakalarında mikroskobik teşhis, günümüzde hala altın standart test olarak kabul edilmektedir. Ancak bu teşhis metodu, özellikle düşük parazitemiye sahip taşıyıcı olarak adlandırılan hayvanlarda yetersiz kalmaktadır (94). Özellikle bu gibi durumlarda, PCR tabanlı moleküler yöntemler kullanılmakta ve teşhiste özgünlük ve spesifite artırılmaktadır. Bu amaçla uygulanan PCR teknikleri için, parazit DNA'sında mevcut olan gen bölgelerinden korunmuş alanlara sahip olanlar genler, hedef gen olarak seçilmekte ve bu genlerin korunmuş bölgelerinin amplifikasyonu için yeni primer dizileri dizayn edilmektedir. Son yıllarda birçok *Babesia* türü ve (443-447) özellikle de *B. bigemina*'nın teşhisi ve moleküler analizleri için AMA-1 hedef gen olarak kullanılmaya başlanmıştır (448-452).

Sivakumar et al. (449) 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada BbigAMA-1'in 738 bp ve 211 bp'lik bölgelerini amplifiye eden primerler dizayn ettiklerini ve uyguladıkları nested PCR tekniği ile amplifikasyonda başarılı olduklarını bildirmişlerdir. Takiben 2012 yılında Sri Lanka'da yapılan bir çalışmada (450), 316 sığırdan toplanan kan örneklerinde *B. bovis*, *B. bigemina*, *T. annulata* ve *T. orientalis*'i araştırılmış ve *B. bigemina* teşhisi için BbigAMA-1'in 211 bp'lik bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR analizi yapılmıştır. Bu çalışmalarında araştırıcılar, *B. bigemina* teşhisinde kullandıkları AMA-1 gen bölgesinin oldukça özgün olduğunu belirtmişlerdir (450). Daha sonra, 2013 yılında Sivakumar et al. (451) Vietnam'da; Ybanez et al. (452) Filipinler'de; 2014 yılında Sivakumar et al. (453) Sri Lanka'da; 2015 yılında Ochirkhuu et al. (454) Filipinler'de, Elsify et al. (448) Mısır'da ve son olarak 2016 yılında Bawm et al. (455) Myanmar'da *B. bigemina*'nın teşhisinde BbigAMA-1 gen bölgesini kullanmışlardır.

AMA-1, *B. bigemina* başta olmak üzere diğer *Babesia* türlerinin teşhisinde sıklıkla hedef gen bölgesi olarak kullanılmasına rağmen yapılan çalışmalarda, filogenetik analizler için yeterli genetik çeşitliliği sağlamadığı ve çoklu hizalama analizlerinde yüksek benzerlik değerlerinin tespit edildiği rapor edilmiştir (448, 451-454). Söz konusu çalışmalarda, *B. bigemina* izolatlarının filogenetik ağaçlarda monofiletik olarak sıralandıkları ve yüksek benzerlik oranlarına sahip oldukları ileri sürülmüştür. Ancak bu çalışmalarda dikkat edilmesi gereken nokta, yapılan PCR analizlerinde AMA-1'in sadece 211 bp'lik bir bölgesinin amplifiye edildiği ve dolayısıyla

moleküler filogenetik analizlerde sadece bu bölge üzerinden değerlendirmenin yapıldığıdır. Çalışmamızda, BbigAMA-1'in tamamının (1788 bp) amplifikasyonu yapılmış, filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde Maximum Likelihood (ML) ve Bayesian analizleri (BA) uygulanmış ve bu analizler için en uygun modelin belirlenmesinde jModelTest 0.0.1 (380) kullanılmıştır. BbigAMA-1 geni nükleotid dizilimlerinin çoklu ve ikili hizalama analizleri sonucunda çalışmamızdan elde edilen Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2 izolatlarının Dünya'dan GenBank kaydı yapılmış diğer izolatlar ile %97,5-%99,9 oranlarında identiklik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, izolatlar arası benzerlik oranlarının çalışmamızda da yüksek bulunması sonuçlarımızın diğer araştırıcıların sonuçlarıyla uyumlu olduğunu göstermektedir. Ancak iki farklı filogenetik yapılandırma analizi kullanarak nükleotid dizilimlere göre oluşturduğumuz filogenetik ağaçlarımızda diğer araştırıcıların sonuçlarından farklı olarak, BbigAMA-1 izolatlarının bölgesel anlamda farklı branşlara ayrıldığı görülmektedir (Şekil 4.11 ve 4.12). Bu nedenle, diğer araştırıcıların raporlarında belirttikleri monofiletik yapılanmaların ve AMA-1'in bölgesel genetik çeşitlilikte yetersiz olduğu ifadelerinin, elde ettikleri izolatlarda BbigAMA-1 geninin sadece 211 bp'lik bir kısmını amplifiye etmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar kapsamında, diğer araştırmalar da göz önüne alındığında, AMA-1'in PCR tabanlı moleküler araştırmalarda teşhis amaçlı kullanımının, içerdiği korunmuş bölgeler nedeniyle tercih edilebilir olduğu anlaşılmaktadır. Ancak AMA-1 tabanlı yapılacak genetik çeşitlilik ve filogenetik çalışmalarda, ya tüm geninin amplifikasyonunun sağlanarak çalışılması ya da parsiyel AMA-1 gen bölgesi tabanlı analizlerin farklı gen bölgeleriyle kombinasyonlu bir şekilde çalışılmasının daha doğru sonuçlar verebileceği düşünülmektedir.

AMA-1, PCR tabanlı moleküler teşhis yöntemlerinde kullanılmasının yanında serolojik teşhis yöntemlerinde de belirleyici antijen olarak kullanılmaya başlanmıştır. Torina et al. (425) yaptıkları bir çalışmada, *B. bigemina*'dan saflaştırdıkları AMA-1 ile ELISA pleytlerini kaplamışlar ve sonrasında geliştirdikleri bu serolojik teşhis yönteminin *B. bigemina*, *B. bovis* ve *Theileria annulata* antikorlarına karşı duyarlılığını test etmişlerdir. Araştırıcılar (425), geliştirdikleri bu ELISA teşhis metodunun hem *B. bigemina* hem de *B. bovis* antikorlarına karşı cross-reaksiyon

gösterdiğini ancak *T. annulata* antikorları için her hangi bir reaksiyonun görülmediğini rapor etmişlerdir. Böylece, *B. bigemina*'dan saflaştırılan AMA-1'in kullanıldığı bu ELISA teşhis metodunun, tür spesifik olmadığını genel olarak babesiosis'e karşı duyarlı olabileceğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlar dikkate alındığında, serolojik teşhislerde meydana gelebilecek cross-reaksiyonlar nedeniyle tür spesifik teşhislerin yapılabildiği DNA tabanlı moleküler yöntemlerin daha güvenilir olduğu görülmektedir.

Bu çalışma ile *B. bigemina*'nın yaşam siklusunda, özellikle de konak hücreye invazyon aşamasında kritik rol oynayan AMA-1'in, Kayseri/Türkiye *in vivo* (1. pasaj) ve *in vitro* (1. pasaj) suşlarında moleküler karakterizasyonu, ekspresyonu ve immunolojik analizi yapılmış, moleküler ağırlığı hesaplanmış ve bu iki suş arasında attenüasyona bağlı olarak meydana gelen moleküler ve immunolojik farklılıklar ortaya konmuştur. Ayrıca, BbigAMA-1 proteinin karakterizasyonu aşamasında mevcut protokoller tekrar dizayn edilmiş ve başarıyla uygulanmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler kapsamında, apikompleksan parazitlerde son derece kritik öneme sahip AMA-1'in, *B. bigemina* için uygun bir aşı adayı hedef protein olup olmadığı da kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile:

1. *B. bigemina* için AMA-1 geninin, diğer tüm *Babesia* türlerinde olduğu gibi intron içermediği,

2. Bu çalışmanın materyalini oluşturan Kayseri/Turkey IV1 ve Kayseri/Turkey IT2 suşlarının nükleotid dizilimlerinin çoklu ve ikili hizalamaları ile yapılan filogenetik analizlerinde, bu iki suşun kendi aralarında %99,8 identiklik gösterdiği her iki suşun en yüksek identikliği GenBank'a kayıtlı "Turkey" suşu (GenBank aksesyon no: JN572801) ile gösterdiği,

3. BbigAMA-1'in tamamının dizilimlerini içeren *B. bigemina* türlerinde, tür içi bir çok polimorfik alanın bulunduğu ve nükleotid dizilimlerinde görülen bu polimorfik alanların, amino asit dizilimlerinde az sayıda mutasyon bölgelerinin oluşmasına sebep olduğu,

4. Nükleotid sekans dizilimlerinin 103. nükleotidlerindeki mutasyondan ileri gelen farklılığın, tahmini antijenik bölgede ve ekstrasellüler domainde yer alan 35. amino asitlerde görülmesi sonucunda bu kritik bölgede bir mutasyon oluştuğu,

5. Bu mutasyonun, DNA tabanlı olarak dizayn edilecek aşılarda farklı koruyucu etkiler yapabileceğinin yanında her iki suşun farklı patojenik etkilere de sahip olabilme ihtimalinin bulunduğu,

6. Aynı tür parazite ait iki farklı suşun, amino asit dizilimlerinde meydana gelen mutasyon nedeniyle BbigAMA-1 proteinlerinin katlanma yerlerinde değişikliklerin oluştuğu ve bu nedenle de farklı IPTG konsantrasyonlarında ve yine farklı zaman aralıklarında eksprese oldukları,

7. *In silico* analizler sonucunda, Kayseri/Turkey IV1 için tahmini moleküler ağırlık 65,90938 kDa olarak Kayseri/Turkey IT2 için ise 65,87536 kDA olarak hesaplanmasına rağmen BbigAMA-1'in rekombinant protein pürifikasyonu sonrasında yapılan Western Blot analizleri sonucunda moleküler ağırlığın her iki suş için de 72 kDa olduğu,

8. AMA-1 tabanlı yapılacak genetik çeşitlilik ve filogenetik çalışmalarda, ya tüm geninin amplifikasyonunun sağlanarak çalışılması ya da parsiyel AMA-1 gen bölgesi tabanlı analizlerin farklı gen bölgeleriyle kombinasyonlu yapılmasının daha doğru sonuçlar vereceği ortaya konmuş,

9. *B. bigemina* Kayseri/Türkiye *in vivo* pasajlanmış suşunun (Kayseri/Turkey IV1) AMA-1 geni nükleotit dizisi KP000032, *in vitro* pasajlanmış suşunun (Kayseri/Turkey IT2) AMA-1 geni nükleotit dizisi ise KP000033 aksesyon numaraları ile GenBank'a kayıt edilmiş ve tescilleri sağlanmıştır.

Elde edilen sonuçlar kapsamında,

i. *B. bigemina* için AMA-1'in güvenilir bir aşı proteini olarak seçilebilmesi tartışmalıdır.

ii. Tartışmalı durumun açıklığa kavuşturulması ve BbigAMA-1'in güvenilir bir aşı proteini olarak seçilebilmesi için Türkiye'nin farklı coğrafik alanlarından elde edilecek çok sayıda yerel *B. bigemina* suş ile *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

iii. Bu çalışmada kullanılan yöntemler ve elde edilen verilerin gelecekte BbigAMA-1 ile ilgili yapılacak çalışmalara model ve temel oluşturacağı ve aynı zamanda araştırıcılara yeni ve farklı perspektifler sunacağı açıktır.

6. KAYNAKLAR

1. Babes V. Sur l'hémoglobinurie bactérienne du boeuf. CR. Acad Sci 1888; 107: 692-694.

2. Smith T, Kilborne FL. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever, 8th and 9th Repts. Bur Anim Industr US Dep Agric 1893; 177-304.

3. Starcovici C. Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krakheiten, die seuchenhafte Hämoglobinurie des Rindes (Babes), dans Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). Zbl Bakt I Abt 1893; 14: 1-8.

4. McCosker JP. The Global Importance of Babesiosis. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press, 1981: p 1-24.

5. Kuttler KL. World-Wide Impact of Babesiosis. In: Ristic M (ed), Babesiosis of Domestic Animals and Man. Boca Raton, FL, CRC Press, 1988: p 1-22.

6. Angus B. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. Int J Parasitol 1996; 26: 1341-1355.

7. Uilenberg G. *Babesia*-A historical overview. Vet Parasitol 2006; 138: 3-10.

8. Skrabalo Z, Deanovic Z. Piroplasmosis in man: report of a case. Doc Med Geog 1957; 9: 11-16.

9. Mimioğlu M, Göksu K, Sayın F. Veteriner ve Tıbbi Protozooloji II. Ankara, Ankara Üniversitesi Basımevi, 1969: 880-966.

10. Düzlü Ö, İnci A. Sığırlarda Görülen Parazit Hastalıkları-Babesiosis. In: Özcel MA, İnci A, Köroğlu E, Karaer Z, Eren H, Yukarı BA, Dumanlı N, Aydın L, Yıldırım A (eds), Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları. İzmir, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, 2013: p 82-101.

11. WEB_1. (2016). The Taxonomicon. http://taxonomicon.taxonomy.nl/ (05.08.2016).

12. Lack JB, Reichard MV, Van Den Bussche RA. Phylogeny and evolution of the *Piroplasmida* as inferred from 18S rRNA sequences. Int J Parasitol 2012; 42: 353-363.

13. Hunfeld KP, Hildebrant A, Gray JS. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. Int J Parasitol 2008; 38: 1219-1237.

14. Schnittger L, Rodriguez AE, Florin-Christensen M, Morrison DA. *Babesia*: a world emerging. Infect Genet Evol 2012; 12(8): 1788-1809.

15. Mahoney DF. *Babesia* of domestic animals. In: Kreier JP (ed), Parasitic Protozoa. New York, Academic Press 1977: p 1-52.

16. Purnell RE. Babesiosis in various hosts. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press, 1981: p 25-64.

17. Friedhoff KT, Smith RD. Transmission of *Babesia* by ticks. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press, 1981: p 268-321.

18. Levine ND. Veterinary Protozoology (1st ed), Iowa State University Press, Ames, 1985: 291-329.

19. Kreier JP, Baker JR. Parasitic Protozoa. Allen and Unwin Inc, Boston, 1987.

20. Geleta AR. Antibody Response to *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by Vaccinated and Unvaccinated Cattle in an Endemic Area of South Africa. Master Thesis, University of Pretoria, 2005.

21. Tonnesen M. Distrubution of *Boophilus microplus* and *Boophilus decoloratus* and Associated Occurrence of *Babesia* Species in Cattle in the Soutpansberg Region, Northern Province, South Africa, Master Thesis, University of Pretoria 2005.

22. Riek RF. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignie`res, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust J Agr Res 1966; 17: 247-254.

23. Soulsby EJL. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, Bailliere Tindall, London, 1986.

24. Friedhoff KT. Transmission of Babesia. In: Ristic M (ed), Babesiosis of Domestic Animals and Man, Boca Raton, Florida, CRC Press, 1988: p 23-52.

25. WEB_2. (2016). Protista. https://www.studyblue.com/notes/note/n/protista-/deck/9694119 (05.08.2016).

26. Gray JS, De Vos A. Studies on a bovine *Babesia* transmitted by *Hyalomma marginatum* rufipes Koch, 1844. Onderstepoort J Vet 1981; 48(4): 215-223.

27. Higuchi S, Ezura K, Hamana M, Kawamura S, Yasuda Y. Development of *Babesia ovata* in the midgut of the tick, *Haemaphysalis longicornis*. Nihon Juigaku Zasshi 1989; 51: 1129-1135.

28. Allsopp MT, Cavalier-Smith T, De Waal DT, Allsopp BA. Phylogeny and evolution of the piroplasms. Parasitology 1994; 108: 147-152.

29. Allsopp MT, Allsopp BA. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. Ann N Y Acad Sci 2006; 1081: 509-517.

30. İnci A, İça A, Albasan H. *Babesia* Enfeksiyonlarında İmmunite. In: Özcel MA, İnci A, Turgay N, Köroğlu E (eds), Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. İzmir, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, 2007: p 508-515.

31. Rudzinska MA. Host-cell-parasite relationships. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press, 1981: p 88-135.

32. Mehlhorn H, Schein E. The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. In: Baker JR, Muller R (eds), Advances in Parasitology. Academic Press, 1984: p 69-89.

33. De Vos AJ, Dalgliesh RJ, Callow LL. Babesia. In: Soulsby EJL (ed), Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis, Vol. III. Boca Raton, CRC Press Inc, 1987.

34. Gray JS, Weiss LM. *Babesia microti*. In: Khan N (ed), Emerging Protozoan Pathogens. Taylor and Francis, Abingdon, UK, 2008: p 303-349.

35. Pinder JC, Fowler RE, Dluzewski AR, et al. Acto-myosin motor in the merozoite of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion. J Cell Sci 1998; 111: 1831-1839.

36. Igarashi I, Aikawa M, Kreier JP. Worldwide impact of Babesiosis. In: Ristic M (ed), Babesiosis of Domestic Animals and Man. Florida, CRC Press, 1988: p 53-71.

37. Cooke BM, Mohandas N, Cowman AF, et al. Cellular adhesive phenomena in apicomplexan parasites of red blood cells. Vet Parasitol 2005; 132: 273-295.

38. Chapman WE, Ward PA. *Babesia rodhaini*: requirement of complement for penetration of human erythrocytes. Science 1977; 196(4285): 67-70.

39. Yokoyama N, Okamura M, Igarashi I. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. Vet Parasitol 2006; 138(1-2): 22-32.

40. Florin-Christensen M, Suarez CE, Hines SA, et al. The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. Infect Immun 2002; 70: 3566-3575.

41. Blackman MJ, Bannister LH. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. Mol Biochem Parasitol 2001; 117: 11-25.

42. Mackenstedt U, Gauer M, Fuchs P, et al. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. Parasitol Res 1995; 81: 595-604.

43. Bock R, Jackson L, De Vos A, Jorgensen W. Babesiosis of cattle. Parasitology 2004; 129: 247-269.

44. Vogl S. Molekular-phylogenetische Differenzierung von Babesien des Rinde. Tierärzt. Fak. Ludwig-Maximillians-Univ.München, Inst. Vergl. Tropenmedizin und Parasitologie, München 2004.

45. Gough JM, Jorgensen WK, Kemp DH. Development of tick gut forms of *Babesia bigemina* in vitro. J Eukaryot Microbiol 1998; 45: 298-306.

46. Agbede RIS, Kemp DH, Hoyte HMD. Secretory and digest cells of female *Boophilus microplus*: invasion and development of *Babesia bovis*; light and electron microscope studies. In: Sauer JR, Hair AJ (eds), Morphology, Physiology and Behavioural Biology of Ticks. New York, Wiley and Sons, 1986: p 457-471.

47. Hoyte HM. Initial development of infectious *Babesia bigemina*. Aust Vet J 1961; 8: 462-466.

48. Potgieter FT, Els HJ. Light and electron microscopic observations on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymphae and non-replete females of *Boophilus decoloratus*. Onderstepoort J Vet 1977; 44: 213-231.

49. Callow LL, Hoyte HMD. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* sp. and the tick cattle *Boophilus microplus*. Aust Vet J 1961; 37: 381-390.

50. Riek RF. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust J Agr Res 1964; 15: 802-821.

51. Dalgliesh RJ, Stewart NP, Callow LL. Transmission of *Babesia bigemina* by transfer of adult male *Boophilus microplus*. Aust Vet J 1978; 54: 205-206.

52. Ouhelli H, Pandey VS, Aboughal A. Effect on infection by *Babesia* spp. on the development and survival of free-living stages of *Boophilus annulatus*. Vet Parasitol 1987; 23: 147-154.

53. Ouhelli H, Schein E. Effect of temperature on transovarial transmission of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in *Boophilus annulatus* (Say, 1921). Vet Parasitol 1988; 26: 229-235.

54. Sayın F, Dumanlı N. Elazıg bölgesinde evcil hayvanlarda görülen kene (Ixodidae) türleri ile ilgili epizootiolojik arastırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1982; 29(3-4): 344-362.

55. Yukarı BA, Nalbantoğlu S, Karaer Z, et al. Laboratuvarda *Hyalomma marginatum*'un bazı biyolojik özellikleri. Turkiye Parazitol Derg 2011; 35(1): 40-42.

56. Bakirci S, Bilgiç HB, Hacilarlioğlu S, ve ark. Laboratuvar şartlarında *Hyalomma excavatum*'un üretilmesi ve kolonizasyonu. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2015; 62: 99-104.

57. Bock RE, Kingston TG, De Vos AJ. Effect of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. Aust Vet J 1999; 77(7): 461-464.

58. Mahoney DF. The Epidemiyology of Babesiosis. In: Johnston J, Cooper MG (eds), Tick and Tick-Borne Disease. Proceedings of a symposium held at the 56th. Annual Conference of the Australian Veterinary Association, 9-11, 1980, Townsville.

59. İnci A, Düzlü Ö, İça A. Babesiidae. In: Dumanlı N, Karaer KZ (eds), Veteriner Protozooloji. 2. baskı, Ankara, Medisan Yayıncılık, 2015: p 193-218.

60. Lempereur L, Lebrun M, Cuvelier P, Sépult G, Caron Y, Saegerman C, Shiels B, Losson B. Longitudinal field study on bovine *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* infections during a grazing season in Belgium. Parasitol Res 2012; 110(4): 1525-1530.

61. Hornok S, Edelhofer R, Szotáczky I, Hajtós I. *Babesia divergens* becoming extinct in cattle of Northeast Hungary: new data on the past and present situation. Acta Vet Hung 2006; 54(4): 493-501.

62. Cringoli G, Otranto D, Testini G, et al. Epidemiology of bovine tick-borne diseases in southern Italy. Vet Res 2002; 33(4): 421-428.

63. Papadopoulos B, Brossard M, Perié NM. Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece. 2. Piroplasms of cattle. Vet Parasitol 1996; 63(1-2): 57-66.

64. Silva MG, Henriques G, Sánchez C, et al. First survey for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Central and Southern regions of Portugal using serological and DNA detection methods. Vet Parasitol 2009; 166(1-2): 66-72.

65. Dreyer K, Fourie LJ, Kok DJ. Epidemiology of tick-borne diseases of cattle in Botshabelo and Thaba Nchu in the Free State Province. Onderstepoort J Vet Res 1998; 65(4): 285-289.

66. Tønnesen MH, Penzhorn BL, Bryson NR, Stoltsz WH, Masibigiri T. Seroprevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in the Soutpansberg region, Limpopo Province, South Africa, associated with changes in vector-tick populations. J S Afr Vet Assoc 2006; 77(2): 61-65.

67. Marufu MC, Chimonyo M, Dzama K, Mapiye C. Seroprevalence of tick-borne diseases in communal cattle reared on sweet and sour rangelands in a semi-arid area of South Africa. Vet J 2010; 184(1): 71-76.

68. Terkawi MA, Thekisoe OM, Katsande C, et al. Serological survey of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in South Africa. Vet Parasitol 2011; 182(2-4): 337-342.

69. Sahibi H, Rhalem A, Berrag B, Goff WL. Bovine babesiosis. Seroprevalence and ticks associated with cattle from two different regions of Morocco. Ann N Y Acad Sci 1998; 849: 213-218.

70. Awad H, Antunes S, Galindo RC, et al. Prevalence and genetic diversity of *Babesia* and *Anaplasma* species in cattle in Sudan. Vet Parasitol 2011; 181(2-4): 146-152.

71. Gitau GK, Perry BD, Katende JM, et al. The prevalence of serum antibodies to tick-borne infections in cattle in smallholder dairy farms in Murang'a District, Kenya; a cross-sectional study. Prev Vet Med 1997; 30(2): 95-107.

72. Okuthe OS, Buyu GE. Prevalence and incidence of tick-borne diseases in smallholder farming systems in the Western-Kenya highlands. Vet Parasitol 2006; 141(3-4): 307-312.

73. Akinboade OA, Dipeolu OO. Comparison of blood smear and indirect fluorescent antibody techniques in detection of haemoparasite infections in trade cattle in Nigeria. Vet Parasitol 1984; 14(2): 95-104.

74. Chandrawathani P, Tsuji N, Kawazu S, Ishikawa M, Fujisaki K. Seroepidemiological studies of bovine babesiosis caused by *Babesia ovata*, *B. bigemina* and *B. bovis* in Peninsular Malaysia. J Vet Med Sci 1994; 56(5): 929-932.

75. Rahman WA, Lye YP, Chandrawathani P. The seroprevalence of bovine babesiosis in Malaysia. Trop Biomed 2010; 27(2): 301-307.

76. Singh H, Mishra AK, Rao JR, Tewari AK. Comparison of indirect fluorescent antibody test (IFAT) and slide enzyme linked immunosorbent assay (SELISA) for diagnosis of *Babesia bigemina* infection in bovines. Trop Anim Health Prod 2009; 41(2): 153-159.

77. Barros SL, Madruga CR, Araújo FR, et al. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies incattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100(6): 513-517.

78. Guedes DS Jr, Araújo FR, Silva FJ, et al. Frequency of antibodies to Babesia bigemina, B. bovis, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the Northeastern region of the State of Pará, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2008; 17(2): 105-109.

79. Da Trindade HI, Silva GR, Teixeira MC, et al. Detection of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in calves from the region of Araguaína, State of Tocantins, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2010; 19(3): 169-173.

80. Iseki H, Zhou L, Kim C, et al. Seroprevalence of *Babesia* infections of dairy cows in northern Thailand. Vet Parasitol 2010; 170(3-4): 193-196.

81. Alfredo AA, Jonsson NN, Finch TM, et al. Serological survey of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle in Tete Province, Mozambique. Trop Anim Health Prod 2005; 37(2): 121-131.

82. Ferreri L, Benitez D, Dominguez M, et al. Water buffalos as carriers of *Babesia bovis* in Argentina. Ann N Y Acad Sci 2008; 1149: 149-151.

83. Woodford JD, Jones TW, Rae PF, Boid R, Bell-Sakyi L. Seroepidemiological studies of bovine babesiosis on Pemba Island, Tanzania. Vet Parasitol 1990; 37(3-4): 175-184.

84. Swai ES, French NP, Karimuribo ED, et al. Spatial and management factors associated with exposure of smallholder dairy cattle in Tanzania to tick-borne pathogens. Int J Parasitol 2005; 35(10): 1085-1096.

85. Swai ES, Karimuribo ED, French NP, et al. Seroprevalence of *Babesia bigemina* in smallholder dairy cattle in Tanzania and associated risk factors. J S Afr Vet Assoc 2007; 78(1): 15-20.

86. Teglas M, Matern E, Lein S, et al. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. Vet Parasitol 2005; 131(1-2): 119-127.

87. Carrique Mas JJ, Widdowson MA, Cuéllar AM, Ribera H, Walker AR. Risk of babesiosis and anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz Department, Bolivia. Vet Parasitoli 2000; 93(1): 29-38.

88. Katsande TC, More SJ, Bock RE, et al. A serological survey of bovine babesiosis in northern and eastern Zimbabwe. Onderstepoort J Vet Res 1999; 66(4): 255-263.

89. Alonso M, Camus E, Rodriguez Diego J, et al. Current status of bovine haemoparasitic diseases in Martinique (French West Indies). Rev Elev Med Vet Pays Trop 1992; 45(1): 9-14.

90. Payne RC, Osorio O. Tick-borne diseases of cattle in Paraguay. I. Seroepidemiological studies on anaplasmosis andbabesiosis. Trop Anim Health Prod 1990; 22(1): 53-60.

91. James MA, Coronado A, Lopez W, Melendez R, Ristic M. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. Trop Anim Health Prod 1985; 17(1): 9-18.

92. Payne RC, Scott JM. Anaplasmosis and babesiosis in El Salvador. Trop Anim Health Prod 1982; 14(2): 75-80.

93. Applewhaite LM, Craig TM, Wagner GG. Serological prevalence of bovine babesiosis in Guyana. Trop Anim Health Prod 1981; 13(1): 13-18.

94. Almeria S, Castellà J, Ferrer D, et al. Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. Vet Parasitol 2001; 99(3): 249-259.

95. Almeria S, Delgado-Neira Y, Adelantado C, et al. Mediterranean theileriosis and other tick transmitted piroplasmoses in cattle in Minorca (Balearic Islands, Spain): the effect of tick control on prevalence levels analyzed by reverse line blot (RLB) macroarrays. J Parasitol 2009; 95(3): 598-603.

96. García-Sanmartín J, Nagore D, García-Pérez AL, Juste RA, Hurtado A. Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. BMC Vet Res 2006; 9: 2-16.

97. Silva MG, Marques PX, Oliva A. Detection of *Babesia* and *Theileria* species infection in cattle from Portugal using a reverse line blotting method. Vet Parasitol 2010; 174(3-4): 199-205.

98. Salih DA, El Hussein AM, Seitzer U, Ahmed JS. Epidemiological studies on tick-borne diseases of cattle in Central Equatoria State, Southern Sudan. Parasitol Res 2007; 101(4): 1035-1044.

99. Salih DA, El Hussein AR, Ahmed J, Seitzer U. Comparison between reverse line blot and enzyme-linked immunosorbent assay in diagnosis of major tick-borne diseases of cattle in Southern Sudan. Transbound Emerg Dis 2010; 57(1-2): 61-62.

100. Tsai YL, Chomel BB, Chang CC, et al. *Bartonella* and *Babesia* infections in cattle and their ticks in Taiwan. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2011; 34(2): 179-187.

101. Martins TM, Neves L, Pedro OC, et al. Molecular detection of *Babesia* spp. and other haemoparasitic infections of cattle in Maputo Province, Mozambique. Parasitology 2010; 137(6): 939-946.

102. M'ghirbi Y, Hurtado A, Barandika JF, et al. A molecular survey of *Theileria* and *Babesia* parasites in cattle, with a note on the distribution of ticks in Tunisia. Parasitol Res 2008; 103 (2): 435-442.

103. Smeenk I, Kelly PJ, Wray K, et al. *Babesia bovis* and *B. bigemina* DNA detected in cattle and ticks from Zimbabwe by polymerase chain reaction. J S Afr Vet Assoc 2000; 71(1): 21-24.

104. Figueroa JV, Alvarez JA, Ramos JA, Vega CA, Buening GM. Use of multiplex polymerase chain reaction-based assay to conduct epidemiological studies on bovine hemoparasites in Mexico. Rev Elev Med Vet Pays Trop 1993; 46(1-2): 71-75.

105. Ekrem İ. Piroplasmoslar hakkında en yeni malumat. Türk Baytarlar Mecmuası 1931; 6: 65-73.

106. Lestoquard M. Piroplasmoslar. Baytari Mecmua 1931; 9: 8-9.

107. Gören S, Yetkin R. Tek tırnaklılarda, sığırda, koyunda, keçide ve köpekte piroplazmoz. Milli Müd Baytar Bakt Serum ve Aşı Evi Yay 1935.

108. Aysoy S. Piroplasmos (Piroplasmose). Tıbbi Klinik Kılavuzu, Talebe Ders Kılavuzu, Sayı 24, Yüksek Ziraat Enstitüsü Matbaası, Ankara 1941.

109. Mimioğlu M. Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu Vilayetlerinde "Haematurai vesicalis bovis"li sığırlarda parasitolojik araştırmalar, Ankara Üniv Vet Fak Derg 1955; 11: 183-192.

110. Kurtpınar H. Erzurum, Kars, Ağrı vilayetlerinde sığır, koyun ve keçilerin yaz aylarına mahsus parazitleri ve bunların doğurduğu hastalıklar. Türk Vet Hek Dern Derg 1956; 26: 3226-3232.

111. Göksu K. Ankara ve civarı sığırlarında theileriosis üzerinde sistematik araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1959; 115: 60.

112. Özcan CH. Ankara ve civarında evcil hayvanlarda görülen Piroplasmose vakaları ve tedavileri üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Basımevi 1961: p 10-106.

113. Erkut HM. Ege bölgesindeki sığırlarda piroplasmosis durumu ve tedavide yeni ilaçlamalar. Bornova Vet Araş Enst Derg 1967; 8: 120-130.

114. Göksu K. Batı Karadeniz bölgesi illerinin sığırlarında gözlenen Babesidae (Sporozoa: Piroplasmida) enfeksiyonları. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1968; 15: 46-57.

115. Göksu K. Doğu Anadolu Bölgesinde hayvanlarda görülen başlıca paraziter hastalıklar ve bunlarla savaşta göz önüne alınacak hususlar. Türk Vet Hek Dern Derg 1969; 39(4): 13-22.

116. Göksu K. Yurdumuzun çeşitli bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları (piroplasmossis, babesiosis, theileriosis ve anaplasmosis'in yayılış durumları). Türk Vet Hek Dern Derg 1970; 40(4): 29-39.

117. Hoffman G, Hörchner F, Scheın E, et al. Saisonales auftreten von zecken und piroplasmen bei haustieren in des asiatischen provinzen der Turkei. Berl Münch Tierarztl Wschr 1971; 84: 152-156.

118. Mimioğlu M, Güler S, Ulutaş M. Untersuchungen über die Blutparasiten bie rindem in der Türkei. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1972; 2: 183-192.

119. Anon. Anaplasmosis, piroplasmosis and theileriosis amongst cattle and sheep in Turkey and the control of the diseases. Bull Off Int Epiz 1976; 86: 27-33.

120. Tüzer E. İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda görülen *Babesia*, *Theileria* ve *Anaplasma* türleri ve bunlardan oluşan enfeksiyonların yayılışı üzerinde araştırma. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 1981; 8(1): 97-110.

121. Dumanlı N, Özer E. Elazığ yöresinde sığırlarda görülen kan parazitleri ve yayılışları üzerinde araştırmalar. Selçuk Üniv Vet Fak Derg 1987; 3(1): 159-166.

122. Sayın F, Friedhoff KT, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A. Beytepe köyünde sığır babesiosisi üzerinde seroepidemiyolojik araştırmalar, 6. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ No:104, 1989, İstanbul.

123. Taşçı S. Van bölgesinde sığır ve koyunlarda görülen kene türleri ile bunların taşıdığı kan parazitleri arasındaki ilişkiler. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1989; 36(1): 53-63.

124. Dinçer Ş, Sayın F, Karaer Z, ve ark. Karadeniz bölgesi sığırlarında, bulunan kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1991; 38(1-2): 206-226.

125. İnci A. Ankara'nın Çubuk İlçesinde Sığırlarda Babesiosis'in Seroinsidensi Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 1992.

126. Özer E, Erdoğmuş SZ, Köroğlu E, ve ark. Malatya ve Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kan parazitleri ve yayılışları. Turk J Vet Am Sci 1993; 17(3): 209-215.

127. Açıcı M. Samsun ve yöresi sığırlarında kan parazitlerinin yayılışı. Etlik Vet Mik Derg 1995; 8(1-2): 271-277.

128. İnci A, Çakmak A, Karaer Z, ve ark. Kayseri yöresinde sığırlarda babesiosisin seroprevalansı. Turk J Vet Anim Sci 2002; 26: 1345-1350.

129. Sevinc F, Sevinc M, Birdane MF, et al. Prevalence of *Babesia bigemina* in cattle. Revue de Méd Vét 2001; 152(5): 395-398.

130. Aktaş M, Dumanlı N, Karaer Z, ve ark. Elazığ, Malatya, ve Tunceli illerinde sığırlarda *Babesia* türlerinin seroprevalansı. Turk J Vet Anim Sci 2001; 25(4): 447-451.

131. Nalbantoğlu S, Vatansever Z, Karaer Z, Cakmak A. The epidemiology of cattle babesiosis in Adana region. Babesia World Summit, December 1-3, 2005, Buenos Aires, Argentina.

132. Sevinç F, Özdemir Ö, Coşkun A. On bir günlük bir buzağıda akut Babesiosis. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2005; 2: 131-135.

133. Sevgili M, Cakmak A, Gokcen A, Altas MG, Ergun G. Prevalence of *Theileria annulata* and *Babesia bigemina* in cattle in the vicinity of Sanliurfa. J Anim Vet Adv 2010; 9(2): 292-296.

134. Düzlü Ö, İnci A, Yıldırım A. Karadeniz Bölgesi'ndeki sığırlardan elde edilen *Babesia bovis* suşlarının moleküler karakterizasyonu. ERÜ Sağ Bil Derg 2011; 20: 18-28.

135. Kalkan K, Özçelik S, Malatyalı E. Sivas'ta sığırlarda babesiosis seroprevalansı. Turkiye Parazitol Derg 2010; 34(1): 11-16.

136. Yavuz A, İnci A, Düzlü Ö, Bişkin Z, Yıldırım A. Molecular characterization of *Babesia bovis* msa-2c gene. Turkiye Parazitol Derg 2011; 35: 140-144.

137. Çakmak A. Untersuchungen zur inzidenz von haemoparasiten in der provinz Ankara. Tierarztl Hochsch Diss Hannover 1987.

138. Sayın F, Friedhoff KT, Dinçer Ş, ve ark. Ankara yöresi sığırlarında kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar, 6. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ No:103, 1989, İstanbul.

139. Eren H. Ankara yöresinde sığır babesiosisinin sero-prevalansı. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1993; 40 (1): 23-37.

140. Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, et al. Studies on seroprevalence of *Babesia* infection of cattle in Turkey. In: Özcel MA (ed), New Dimensions in Parasitology, 1996: p 505-516.

141. Vatansever, Z., Nalbantoğlu, S., Çakmak, A. Çukurova bölgesinde sığır babesiosis'nin epidemiyolojisi. 12. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 2001, Elazığ.

142. Vatansever Z, İça A, Deniz A, ve ark. Ankara yöresinde sığırlarda kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının yayılışının reverse line blotting (RLB)ve indirek floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ Özetleri. 194, 2003, Konya.

143. İça A. Sığırlarda bazı *Babesia* türlerinin indirek floresan antikor ve reverse line blotting yöntemi ile karşılaştırmalı tanısı. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2004; 1(2): 77-85.

144. Kaya G, Cakmak A, Karaer Z. Seroprevalance of theileriosis and babesiosis of cattle. Medycyna Wet 2006; 62 (2): 156-158.

145. Çakmak A, Öz İ. Adana yöresi sığırlarında kan protozoonlarının serodiagnozu. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1993; 40(1): 70-77.

146. Öncel T, Vural G, Karaer Z, et al. Türkiye'de sığırlarda *Babesia bovis* ve *B. bigemina*'nın seroprevalansı. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2010; 37(1): 33-42.

147. Açıcı M, Bölükbaş CS, Pekmezci GZ, et al. Seroepidemiological survey of bovine tick-borne infections in the Black Sea Region of Turkey. Turk J Vet Anim Sci 2016; 40: 170-174.

148. Yıldırım A, Düzlü Ö, İnci A, Önder Z, Çiloğlu A. Sığırlarda *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın Reverse Line Blotting, Nested PCR ve Real Time PCR teknikleri ile karşılaştırmalı tanısı. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013; 19: 895-902.

149. Tanyüksel M, Vatansever Z, Karaer Z, ve ark. Sığır babesiosisinin epidemiyolojisi ve zoonotik önemi. Turkiye Parazitol Derg 2002; 26(1): 42-47.

150. İça 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 2007; 31: 33-38.

151. İca A, Vatansever Z, Yildirim A, et al. Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. Vet Parasitol 2007; 148(2): 156-160.

152. İnci A, İça A, Florin-Christensen M, ve ark. Türkiye'nin çeşitli yörelerinden elde edilen *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın moleküler karakterizasyonu, 15. Ulusal Parazitoloji Kongresi, s 163-164, 18-23 Kasım 2007, Kayseri ve Ürgüp.

153. İça A, İnci A, Yıldırım A, ve ark. Türkiye'de sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin moleküler prevalansı. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, s 215, 1-7 Kasım 2009, Adana.

154. Altay K, Aydin MF, Dumanli N, et al. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. Vet Parasitol 2008; 158: 295-301.

155. Aktas M, Ozubek S. Molecular and parasitological survey of bovine piroplasms in the Black Sea Region, including the first report of babesiosis associated with *Babesia divergens* in Turkey. J Med Entomol 2015; 52(6): 1344-1350.

156. Düzlü Ö, Yildirim A, İnci A, Avcıoğlu H, Balkaya İ. Investigation of Babesia bovis and Babesia bigemina in cattle by Real Time PCR and molecular characterization of the isolates. Ankara Univ Vet Fak Derg 2015; 62: 27-35.

157. Zhou M, Cao S, Sevinc F, et al. Molecular detection and genetic identification of *Babesia bigemina*, *Theileria annulata*, *Theileria orientalis* and *Anaplasma marginale* in Turkey. Ticks Tick Borne Dis 2016; 7(1): 126-134.

158. Düzgün A, Alabay M, Çerçi H, et al. A serological study for babesiosis in cattle in Turkey using the ELISA test. IAEA-TECDOC-657, 1991: p 175-177.

159. Bilgin Z. Trakya'da Sığırlarda Bulunan *Theileria* ve *Babesia* Türlerinin ve Bunların Sığırlarda Yaygınlığının Reverse Line Blooting (RLB) Tekniği ile Araştırılması, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2007.

160. Mimioğlu M, Ulutaş M, Güler S. Yurdumuz sığırlarında theileriosis etkenleri ve diğer kan parazitleri. Ajans-Türk Matbaacılık Sanayi, Ankara 1971.

161. Altay K, Aktas M, Dumanli N, et al.. Evaluation of a PCR and comparison with RLB for detection and differentiation of *Theileria* sp. MK and other *Theileria* and *Babesia* species of small ruminants. Parasitol Res 2008; 103: 319-323.

162. Zintl A, Gray JS, Skerrett HE, Mulcahy G. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. Parasite Immunol 2005; 27(4): 115-120.

163. Wright IG, Goodger BV. Pathogenesis of Babesiosis. In: Ristic M (ed), Babesiosis of Domestic Animals and Man. Boca Raton, Florida, CRC Press 1988: p 99-118.

164. Sonenshine DE. Biology of Ticks, Vol II, Chapter V, Oxford University Press, Oxford, 1993.

165. Hiepe T, Jungman R. Lehrbuch der Parasitologie, Veterinarmedizinische Protozoologie (Band 2), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1983.

166. Ristic M. Research on Babesiosis Vaccines. In: Ristic M, Amrtouse T, Kreier JP (eds), Malaria and Babesiosis. Martinus Nijhoff Publisher, 1984: p 103-121.

167. Minjauw B, McLeod A. Tick-borne disease and povert, Research report, DFID Animal Health Programme, Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh, UK, 2003.

168. Carpenter JW. Exotic Animal Formularly (3 rd ed), Elsevier Inc, Missouri, 2005: 20-22.

169. Habela MA, Reina D, Navarrete I, Redondo E, Hernandez S. Histopathological changes in sheep experimentally infected with *Babesia ovis*. Vet Parasitol 1991; 38: 1-12.

170. Sevinç F. Konya Yöresi Koyunlarında *Babesia ovis*'in ELISA ile Teşhisi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Saglık Bilimleri Enstitüsü, Konya 1996.

171. Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, et al. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. Clin Microbiol Rev 2003; 16(4): 622-636.

172. Clark IA, Jacobson LS. Do babesiosis and malaria share a common disease process? Ann Trop Med Parasitol 2005; 92(4): 483-488.

173. Yukarı BA, Karaer Z. Babesiosis. Vet Hek Dern Derg 1996; 67: 46-54.

174. De Vos AJ, Jorgensen WK, Molloy JB. Bovine babesiosis. Manual of Standards for Diagnostic Tests Vaccines, (4 th ed) OIE, Paris, 2000: 412-422.

175. Dik B, Sevinç F. Veteriner Protozooloji. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya, 2002.

176. Mahoney DF. Studies on the Protection of Cattle Against *Babesia bovis* Infection. In: Dunsmore JD (ed), Tropical Parasitoses and Parasitic Zoonoses. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 1983: p 93-104.

177. Zwart D, Brocklesby DW. Babesiosis: non-specific resistance, immunological factors and pathogenesis. Adv Parasitol 1979; 17: 49-113.

178. Levy MG, Clabaugh G, Ristic M. Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. Infect Immun 1982; 37(3): 1127-1131.

179. Wright IG, Goodger BV, Leatch G, et al. Protection of *Babesia bigemina*-immune animals against subsequent challenge with virulent *Babesia bovis*. Infect Immun 1987; 55: 364-368.

180. Blood DC, Radostits OM. Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. Seventh ed ELBS, Bailliere, Tindall, London, 1989.

181. Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford III SR, et al. Babesiosis. Clin Microbiol Rev 2000; 13(3): 451-469.

182. Brown WC, Estes DM, Chantler SE, et al. DNA and a CpG oligonucleotide derived from *Babesia bovis* are mitogenic for bovine B cells. Infect Immun 1998; 66(11): 5423-5432.

183. Werling D, Hope JC, Howard CJ, et al. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. Immunology 2004; 111(1): 41-52.

184. Tizard IR. Veterinary immunolgy: An Introduction (8 th ed), Saunders, 2009: 312-329.

185. De Waal DT, Combrink MP. Live vaccines against bovine babesiosis.Vet Parasitol 2006; 138(1-2): 88-96.

186. Shkap V, Rasulov I, Abdurasulov S, et al. *Babesia bigemina*: attenuation of an Uzbek isolate for immunization of cattle with live calf- or culture-derived parasites. Vet Parasitol 2007; 146(3-4): 221-226.

187. Goff WL, Johnson WC, Tuo W. et al. Age-related innate immune response in calves to *Babesia bovis* involves IL-12 induction and IL-10 modulation. Ann NY Acad Sci 2002; 969: 164-168.

188. Callow LL. Bovine babesiosis in Australia, Animal Health in Australia. Australian Government Publishing Service, Canberra, 1984: 139-160.

189. Callow LL, Dalgliesh RJ. Immunity and Immunopathology in Babesiosis. In: Cohen S, Warren KS (eds), Immunology of Parasitic Infections. 2 nd ed. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne, Blackwell Scientific Publications, 1982: p 475-527.

190. Allred DR, Al-Khedery B. Antigenic variation as an exploitable weakness of babesial parasites. Vet Parasitol 2006; 138(1-2): 50-60.

191. Mosqueda J, McElwain TF, Palmer GH. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. Infect Immun 2002; 70(11): 6448-6455.

192. Gaffar FR, Yatsuda AP, Franssen FJ, Vries E. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. Infect Immun 2004; 72: 2947-2955.

193. Torina A, Agnone A, Sireci G. Characterization of the apical membrane antigen-1 in Italian strains of *Babesia bigemina*. Transbound Emerg Dis 2010; 57(1-2): 52-56.

194. AbouLaila M, Terkawi MA, Seuseu FJ, et al. Expression and immunological characterization of the heat shock protein-70 homologue from *Babesia bigemina*. Vet Parasitol 2012; 190(3-4): 401-410.

195. Eugui EM, Allison AC. Differences in susceptibility of various mouse strains to haemoprotozoan infections: possible correlation with natural killer activity. Parasitol Immunol 1980; 2: 277-292.

196. Goff WL, Johnson WC, Cluff CW. *Babesia bovis* immunity. *In vitro* and *in vivo* evidence for IL-10 regulation of IFN-gamma and iNOS. Ann NY Acad Sci 1998; 849: 161-180.

197. Brown WC, Norimine J, Goff WL, Suarez CE, Mcelwain TF. Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. Parasite Immunol 2006; 28: 315-327.

198. Brown GK, Canfield PJ, Dunstan RH, et al. Detection of *Anaplasma* platys and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. Aust Vet J 2006; 84(9): 321-325.

199. Shoda LK, Palmer GH, Florin-Christensen J, et al. *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1beta, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. Infect Immun 2000; 68(9): 5139-5145.

200. Shoda LKM, Kegerreis KA, Suarez CE, et al. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor-alpha, and nitric oxide. Infect Immun 2001; 69: 2162-2171.

201. Yarovinski F, Zhang D, Andersen JF. TLR11 activation of dendritic cells by a protozooan profilin-like protein. Science 2005; 308: 1626-1629.

202. Zhang D, Zhang G, Hayden MS. A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. Science 2004, 303: 1522-1526.

203. Lauw FN, Caffrey DR, Golenbock DT. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. Trends Immunol 2005; 26: 509-511.

204. McGuire TC, Musoke AJ, Kurtii T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils, and skin. Immunology 1979; 38: 249-256.

205. Dalgliesh RJ. Babesiosis. In: Warren KS (ed), Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections. Oxford, Blackwell, 1993: p 352-383.

206. Estes DM, Closser NM, Allen GK. IFN-γ stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti-μ and mitogen. Cell Immunol 1994; 154: 287-295.

207. Echaide IE, Hines SA, McElwain TF, et al. In vivo binding of immunoglobulin M to the surfaces of *Babesia bigemina*-infected erythrocytes. Infect Immun 1998; 66: 2922-2927.

208. Parrodi F, Jacobson RH, Wright IG, et al. The effect of immune serum and complement on the in vitro phagocytosis of *Babesia rodhaini*. Parasite Immunol 1991; 13: 457-471.

209. Meeusen E, Lloyd S, Soulsby EJ. *Babesia microti* in mice: adoptive transfer of immunity with serum and cells. Aust J Exp Biol Med Sci 1984; 62: 551-566.

210. Ruebush MJ, Hanson WL. Transfer of immunity to *Babesia microti* of human origin using T lymphocytes in mice. Cell Immunol 1980; 52: 255-265.

211. Clark IA, Allison AC. *Babesia microti* and *Plasmodium berghei* yoelii infections in nude mice. Nature 1974; 252: 328-329.

212. Zivkovic D, Speksnijder JE, Kuil H, et al. Immunity to *Babesia* in mice. III. The effects of corticosteroids and anti-thymocyte serum on mice immune to *Babesia rodhaini*. Vet Immunol 1985; 9: 131-142.

213. Matsubara J, Koura M, Kamiyama T. Infection of immunodeficient mice with a mouse-adapted substrain of the gray strain of *Babesia microti*. J Parasitol 1993; 79: 783-786.

214. Ruebush MJ, Troutman EH, Kennedy DA. Delayed-type hypersensitivity to *Babesia microti*-infected erythrocytes in mice. Cell Immunol 1986; 98: 289-299.

215. Igarashi I, Waki S, Ito M, et al. Role of $CD4^+$ T cells in the control of primary infection with *Babesia microti* in mice. J Protozool Res 1994; 4: 164-171.

216. Shimada T, Shikano S, Hashiguchi R, et al. Effects of depletion of T cell subpopulations on the course of infection and anti-parasite delayed type hypersensitivity response in mice infected with *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*. J Vet Med Sci 1996; 58: 343-347.

217. Quick RE, Herwaldt BL, Thomford JW. Babesiosis in Washington State: a new species of *Babesia*? Ann Int Med 1993; 119: 284-290.

218. Hemmer RM, Ferrick DA, Conrad PA. Role of T cells and cytokines in fatal and resolving experimental babesiosis: protection in TNFR p55 -/- mice infected with the human *Babesia* WA1 parasite. J Parasitol 2000; 86: 736-742.

219. Aguilar-Delfin I, Homer MJ, Wettstein PJ, et al. Innate resistance to *Babesia* infection is influenced by genetic background and gender. Infect Immun 2001; 69: 7955-7958.

220. Zivkovic D, Seinen W, Kuil H, et al. Immunity to *Babesia i*n mice. I. adoptive transfer of immunity to *Babesia rodhaini* with immune spleen cells and the effect of irradiation on the protection of immune mice. Vet Immunol 1984; 5: 343-357.

221. Skotarczak B. Babesiosis of human and domestic dog; ethiology, pathogenesis, diagnostics. Wiad Parazytol 2007; 53(4): 271-280.

222. Kim C, Alhassan A, Verdida RA, et al. Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis. Vet Parasitol 2007; 148(2): 137-143.

223. Böse R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, De Vos AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. Vet Parasitol 1995; 57: 61-74.

224. Rosenblatt JE. Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites. Clin Infect Dis 2009; 49(7): 1103-1108.

225. Ristic M. Babesiosis. In: Ristic M (ed), Diseases of Cattle in the Tropics. Intyre Mc, The Hauge, 1981: p 443-468.

226. Ross JP, Lohr KF. Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. Res Vet Sci 1968; 9: 557-562.

227. Johnston LAY, Trueman KF, Pearson RD. Bovine babesiosis: Comparison of fluorescent antibody and giemsa staining in post-mortem diagnosis of infection. Aust Vet J 1977; 53: 222-226.

228. Weiland G, Reiter I. Methods for the Measurement of the Serological Response to *Babesia*. In Ristic M (ed), Babesiosis of Domestic Animals and Man, Boca Raton, CRC Press, 1988: p 146-162.

229. Bakheit MA, Seitzer U, Mbati PA, et al. Serological diagnostic tools for the major tick-borne protozoan diseases of livestock. Parassitologia 2007; 49 (Suppl 1): 53-62.

230. Rehbein G, Heidrich-Joswig S. Use of schizont and piroplasm antigens of *Babesia equi* in the indirect fluorescent antibody and complement fixation tests. Vet Parasitol 1983; 12(2): 135-144.

231. Weiland G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Vet Parasitol 1986; 20(1-3): 43-48.

232. Singh H, Mishra AK, Rao JR, et al. Comparison of indirect fluorescent antibody test (IFAT) and slide enzyme linked immunosorbent assay (SELISA) for diagnosis of *Babesia bigemina* infection in bovines. Trop Anim Health Prod 2009; 41(2): 153-159.

233. Urdaz-Rodríguez JH, Fosgate GT, Waghela SD, et al. Seroprevalence estimation and management factors associated with high herd seropositivity for *Babesia bovis* in commercial dairy farms of Puerto Rico. Trop Anim Health Prod 2009; 41(7): 1465-1473.

234. Cantu CA, Ortega-S JA, García-Vázquez Z, et al. Epizootiology of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in free-ranging white-tailed deer in northeastern Mexico. J Parasitol 2009; 95(3): 536-542.

235. Altangerel K, Alhassan A, Iseki H, et al. Evaluation of *Babesia bigemina* 200 kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. Parasitol Res 2009; 105(1): 249-254.

236. Criado-Fornelio A. A review of nucleic-acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasms. Parassitologia 2007; 49(Suppl 1): 39-44.

237. Lau AO, Tibbals DL, McElwain TF. *Babesia bovis*: the development of an expression oligonucleotide microarray. Exp Parasitol 2007; 117(1): 93-98.

238. Liu Q, Zhou YQ, Zhou DN, et al. Semi-nested PCR detection of *Babesia orientalis* in its natural hosts *Rhipicephalus haemaphysaloides* and buffalo. Vet Parasitol 2007; 143(3-4): 260-266.

239. Iseki H, Alhassan A, Ohta N, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. J Microbiol Methods 2007; 71(3): 281-287.

240. Kledmanee K, Suwanpakdee S, Krajangwong S, et al. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and

Hepatozoon canis in canine blood. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2009; 40(1): 35-39.

241. Kim C, Iseki H, Herbas MS, et al. Development of TaqMan-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Am J Trop Med Hyg 2007; 77(5): 837-841.

242. Laughery JM, Lau AO, White SN, et al. *Babesia bovis*: transcriptional analysis of rRNA gene unit expression. Exp Parasitol 2009; 123(1): 45-50.

243. Suarez CE, McElwain TF. Stable expression of a GFP-BSD fusion protein in *Babesia bovis* merozoites. Int J Parasitol 2009; 39(3): 289-297.

244. Wilkowsky SE, Farber M, Echaide I, et al. *Babesia bovis* merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. Mol Biochem Parasitol 2003; 127(2): 133-141.

245. Borgonio V, Mosqueda J, Genis AD, et al. *msa-1* and *msa-2c* gene analysis and common epitopes assessment in Mexican *Babesia bovis* isolates. Ann N Y Acad Sci 2008; 1149: 145-148.

246. Mosqueda J, McElwain TF, Stiller D, et al. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. Infect Immun 2002; 70(3): 1599-1603.

247. Ramos CA, Araújo FR, Souza II, et al. Real-time polymerase chain reaction based on msa2c gene for detection of *Babesia bovis*. Vet Parasitol 2011; 176(1): 79-83.

248. Guerrero FD, Bendele KG, Davey RB, George JE. Detection of *Babesia bigemina* infection in strains of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* collected from outbreaks in south Texas. Vet Parasitol 2007; 145(1-2):156-163.

249. Kim DM, Park G, Kim HS, et al. Comparison of conventional, nested, and real-time quantitative PCR for diagnosis of scrub typhus. J Clin Microbiol 2011; 49(2): 607-612.

250. Aboulaila M, Nakamura K, Govind Y, et al. Evaluation of the in vitro growth-inhibitory effect of epoxomicin on *Babesia* parasites. Vet Parasitol 2010; 167(1): 19-27.

251. Terkawi MA, Huyen NX, Shinuo C, et al. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. Vet Parasitol. 2011; 178(3-4): 201-207.

252. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med 2006; 27: 95-125.

253. Criado-Fornelio A, Buling A, Asenzo G, et al. Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. Vet Parasitol 2009; 162: 200-206.

254. Sparagano OAE, Carelli G, Ceci L, et al. Pan Mediterranean comparison for the molecular detection of *Theileria annulata*. Ann Ny Acad Sci 2002; 969: 73-77.

255. Ceci L, Jongejan F, Carelli G, Tassi P, Sparagano O. Identification of *Theileria buffeli/orientalis* and *Babesia bigemina* in Apulian cattle using molecular techniques and study of changes in blood parameters. Parassitologia 1999; 41(Suppl 1): 31-32.

256. Almeria S, Castella J, Ferrer D, et al. Reverse line blot hybridization used to identify hemoprotozoa in Minorcan cattle. Ann Ny Acad Sci 2002; 969: 78-82.

257. Mohamed AA, Yagoup IA. Outbreaks of babesiosis in domestic livestock in the eastern region of the Sudan. Trop Anim Health Pro 1990; 22(2): 123-125.

258. Kuttler KL, Johnson LW. Chemoprophylactic activity of imidocarb, diminazene and oxytetracycline against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. Vet Parasitol 1986; 21: 107-118.

259. Kaya S, Pirinçci İ. Protozoonları Etkileyen İlaçlar. In: Kaya S (ed), Veteriner Farmakoloji. Cilt 2, Baskı 4. Ankara, Medisan Yayın Serisi, 2007: p 562-565.

260. Vial HJ, Gorenflot A. Chemotherapy against babesiosis. Vet Parasitol 2006; 138: 147-160.

261. Karaer Z, Nalbantoglu S. Protozoon Hastalıklarında Tedavi. In: Burgu A, Karaer Z (eds), Parazit Hastalıklarında Tedavi. İzmir, Türkiye Parazitoloji Dernegi, 2005: p 1-19.

262. Kuttler KL, Gipson CA, Goff WL, et al. Experimental *Babesia equi* infection in mature horses. Am J Vet Res 1986; 47(8): 1668-1670.

263. Rashid HB, Chaudhry M, Rashid H, et al. Comparative efficacy of diminazene diaceturate and diminazene aceturate for the treatment of babesiosis in horses. Trop Anim Health Prod 2008; 40(6): 463-467.

264. Aryeetey R, Jimenez-Lucho V. Babesiosis. Curr Treat Options Infect Dis 2002; 4: 319-326.

265. Sakuma M, Setoguchi A, Endo Y. Possible emergence of drug-resistant variants of *Babesia gibsoni* in clinical cases treated with atovaquone and azithromycin. J Vet Intern Med 2009; 23(3): 493-498.

266. Häselbarth K, Tenter AM, Brade V, et al. First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. Int J Med Microbiol 2007; 297(3): 197-204.

267. Wijaya A, Wulansari R, Ano H, et al. Effect of clindamycin therapy on phagocytic and oxidative activity profiles of spleen mononuclear cells in *Babesia rodhaini*-infected mice. J Vet Med Sci/Jpn Soc Vet Sci 2001; 63: 563-566.

268. Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB. The treatment of babesiosis. N Engl J Med 2001; 344: 773.

269. WEB_3 (2016). T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. http://www.gkgm.gov.tr/vtu/EMDetay.aspx?ID=486 (05.08.2016).

270. İnci A, Yıldırım A, Düzlü Ö. Entegre Kene Kontrolü ve Tick-borne Hastalıkların Önlenmesi. In: İnci A (ed), Kenelerin Medikal ve Veteriner Önemleri, Kayseri, Erciyes Üniversitesi Yayınları, 2016: p 128-139.

271. Rodríguez M, Penichet ML, Mouris AE, et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with recombinant Bm86 antigen preparation. Vet Parasitol 1995; 57: 339-349.

272. Pipano E, Alekceev E, Galker F, et al. Immunity against *Boophilus annulatus* induced by the Bm86 (Tick-GARD) vaccine. Exp Appl Acarol 2003; 29(1-2): 141-149.

273. De Vos AJ, Bock RE. Vaccination against bovine Babesiosis. Ann N Y Acad Sci 2000; 916: 540-545.

274. Lodos J, Boue O, De la Fuente J. A modelto stimulate the effect of vaccination against *Boophilus* ticks on cattle. Vet Parasitol 2000; 87: 315-326.

275. Odongo D, Kamau L, Skilton R, et al. Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. Vaccine 2007; 25(7): 1287-1296.

276. De la Fuente J, Kocan KM. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. Parasite Immunol 2006; 28(7): 275-283.

277. Pipano E. Live vaccines against hemoparasitic diseases in livestock. Vet Parasitol 1995; 57(1-3): 213-231.

278. Callow LL, Dalgliesh RJ, De Vos AJ. Development of effective living vaccines against bovine babesiosis-the longest field trial. Int J Parasit 1997; 27: 747-767.

279. Bock RE, De Vos AJ, Lew AE, et al. Studies on failure of T strain live *Babesia bovis* vaccine. Aust Vet J 1995; 72: 296-300.

280. Standfast NF, Bock RE, Wiecek MM, et al. Overcoming constraints to meeting increased demand for *Babesia bigemina* vaccine in Australia. Vet Parasitol 2003; 115: 213-222.

281. Hines SA, Palmer GH, Jasmer DP, et al. Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. Infec Immun 1995; 63: 349-352.

282. Wright IG, Casu R, Commins MA, et al. The development of a recombinant *Babesia* vaccine. Vet Parasitol 1992; 44: 3-13.

283. Brayton KA, Lau AO, Herndon DR, et al. Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. PLoS Pathog 2007; 3(10): 1401-1413.

284. Langsley G, van Noort V, Carret C, et al. Comparative genomics of the Rab protein family in Apicomplexan parasites. Microbes Infect 2008; 10(5): 462-470.

285. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. J Cell Biol 1983; 97: 329-339.

286. Kahraman T, Güçlüer G, Gürsel İ. Eksozomlar: tanı ve tedavide kullanılabilen doğal nanokesecik adayları. Turk J Immunol 2014; 2(2): 34-40.

287. Martin-Jaular L, Nakayasu ES, Ferrer M, Almeida IC, Del Portillo HA. Exosomes from *Plasmodium yoelii*-infected reticulocytes protect mice from lethal infections. Plos One 2011; 6(10): e26588.

288. Hakansson S, Charron AJ, Sibley LD. *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. EMBO J 2001; 20: 3132-3144.

289. Théry C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. F1000 Biol Rep 2011; 3: 15.

290. Février B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. Curr Opin Cell Biol 2004; 16: 415-421.

291. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. Nat Commun 2011; 2: 282.

292. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. Curr Opin Cell Biol 2009; 21: 575-581.

293. Suarez CE, McElwain TF, Stephens EB, et al. Sequence conservation among merozoite apical complex proteins of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and other apicomplexa. Mol Biochem Parasitol 1991; 49 (2): 329-332.

294. Sam-Yellowe TY. Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. Parasitol Today 1996; 12: 308-316.

295. Howell SA, Well I, Fleck SL, et al. A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. J Biol Chem 2003; 278: 23890-23898.

296. Matuschewski K, Nunes AC, Nussenzweig V, et al. *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. EMBO J 2002; 21: 1597-1606.

297. Jasmer DP, Reduker DW, Hines SA, et al. Surface epitope localization and gene structure of a *Babesia bovis* 44-kilodalton variable merozoite surface antigen. Mol Biochem Parasitol 1992; 55: 75-83.

298. Ruef BJ, Dowling SC, Conley PG, et al. A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane. Mol Biochem Parasitol 2000; 105: 1-12.

299. Heintzelman MB, Schwartzman JD. Myosin diversity in apicomplexa. J Parasitol 2001; 87: 429-432.

300. Hettmann C, Herm A, Geiter A, et al. A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. Mol Biol Cell 2000; 11: 1385-1400.

301. Pinder JC, Fowler RE, Bannister LH, et al. Motile systems in malaria merozoites: how is the red blood cell invaded? Parasitol Today 2000; 16: 240-245.

302. Varki A. N-Glycolylneuraminic acid deficiency in humans. Biochimie 2001; 83: 615-622.

303. Zintl A, Westbrook C, Skerrett HE, et al. Chymotrypsin and neuraminidase treatment inhibits host cell invasion by *Babesia divergens* (phylum Apicomplexa). Parasitology 2002; 125: 45-50.

304. Gaffar FR, Franssen FF, de Vries E. *Babesia bovis* merozoites invade human, ovine, equine, porcine, and caprine erythrocytes by a sialic acid-dependent mechanism followed by developmental arrest after a single round of cell fission. Int J Parasitol 2003; 33: 1595-1603.

305. Bork S, Yokoyama N, Ikehara Y, et al. Growth-inhibitory effect of heparin on *Babesia* parasites. Antimicrob Agents Ch 2004; 48(1): 236-241.

306. Hileman RE, Fromm JR, Weiler JM, et al. Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. Bioessays 1998; 20: 156-167.

307. Mulloy B, Forster MJ. Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. Glycobiology 2000; 10: 1147-1156.

308. İnci A, Uyanık F. *Babesia* türlerinin moleküler biyolojisi. In: Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H (eds), Moleküler Parazitoloji. İzmir, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, 2009: p 549-582.

309. Upston JM, Gero AM. Increased glucose permeability in *Babesia bovis*-infected erythrocytes. Int J Parasitol 1990; 20(1): 69-76.

310. Alkhalil A, Hill DA, Desai SA. *Babesia* and plasmodia increase host erythrocyte permeability through distinct mechanisms. Cell Microbiol 2007; 9(4): 851-860.

311. Ohmori T, Adachi K, Fukuda Y, et al. Glucose uptake activity in murine red blood cells infected with *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*. J Vet Med Sci 2004; 66(8): 945-949.

312. Barry DN. Metabolism of *Babesia* parasites *in vitro*. Change in adenylate energy charge and infectivity of *Babesia rodhaini*-infected erythrocytes. Aust J Exp Biol Med Sci 1984; 62(Pt 1): 63-71.

313. Seeber F, Limenitakis J, Soldati-Favre D. Apicomplexan mitochondrial metabolism: a story of gains, losses and retentions. Trends Parasitol 2008; 24(10): 468-478.

314. Allred DR. Antigenic variation in babesiosis: is there more than one ‘‘why’’? Microbes Infect 2001; 3: 481-491.

315. Wilkowsky SE, Moretta R, Mosqueda J, et al. A new set of molecular markers for the genotyping of *Babesia bovis* isolates. Vet Parasitol 2009; 161(1-2): 9-18.

316. Cowman AF, Bernard O, Stewart N, et al. Genes of the protozoan parasite *Babesia bovis* that rearrange to produce RNA species with different sequences. Cell 1984; 37(2): 653-660.

317. Hines SA, Palmer GH, Jasmer DP, et al. Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. Mol Biochem Parasitol 1992; 55: 85-94.

318. Palmer GH, McElwain TF, Perryman LE, et al. Strain variation of *Babesia bovis* merozoite surface-exposed epitopes. Infect Immun 1991; 59(9): 3340-3342

319. Suarez CE, Palmer GH, Hötzel I, et al. Sequence and functional analysis of the intergenic regions separating babesial rhoptry-associated protein-1 (rap-1) genes. Exp Parasitol 1998; 90(2): 189-194.

320. Mishra VS, McElwain TF, Dame JB, et al. Isolation, sequence and differential expression of the p58 gene family of *Babesia bigemina*. Mol Biochem Parasitol 1992; 53(1-2): 149-158.

321. Dalrymple BP, Casu RE, Peters JM, et al. Characterisation of a family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis*. Mol Biochem Parasitol 1993; 57(2): 181-192.

322. Hötzel I, Suarez CE, McElwain TF, et al. Genetic variation in the dimorphic regions of RAP-1 genes and rap-1 loci of *Babesia bigemina*. Mol Biochem Parasitol 1997; 90(2): 479-489.

323. Suarez CE, Palmer GH, Florin-Christensen M, et al. Organization, transcription, and expression of rhoptry associated protein genes in the *Babesia bigemina* rap-1 locus. Mol Biochem Parasitol 2003; 127(2): 101-112.

324. Narum DL, Thomas AW. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. Mol Biochem Parasitol 1994; 67(1): 59-68.

325. Remarque EJ, Faber BW, Kocken CH, Thomas AW. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. Trends Parasitol 2008; 24: 74-84.

326. Deans JA, Alderson T, Thomas A, et al. Rat monoclonal antibodies which inhibit the in vitro multiplication of *Plasmodium knowlesi*. Clin Exp Immunol 1982; 49: 297-309.

327. Healer J, Crawford S, Ralph S, McFadden G, Cowman AF, et al. Independent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. Infect Immun 2002; 70: 5751-5758.

328. Thomas AW, Deans JA, Mitchell GH, Alderson T, Cohen S. The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. Mol Biochem Parasitol 1984; 13: 187-199.

329. Hehl AB, Lekutis C, Grigg ME, et al. *Toxoplasma gondii* homologue of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. Infect Immun 2000; 68(12): 7078-7086.

330. Triglia T, Healer J, Caruana SR, et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. Mol Microbiol 2000; 38: 706-718.

331. Mital J, Meissner M, Soldati D, Ward GE. Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. Mol Biol Cell 2005; 16(9): 4341-4349.

332. Healer J, Triglia T, Hodder AN, Gemmill AW, Cowman AF. Functional analysis of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 utilizing interspecies domains. Infect Immun 2005; 73: 2444-2451.

333. Treeck M, Zacherl S, Herrmann S, et al. Functional analysis of the leading malaria vaccine candidate AMA-1 reveals an essential role for the cytoplasmic domain in the invasion process. Plos Pathog 2009; 5: e1000322.

334. Sheiner L, Santos JM, Klages N, et al. *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. Mol Microbiol 2010; 77: 912-929.

335. Leykauf K, Treeck M, Gilson PR, et al. Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite. Plos Pathog 2010; 6: e1000941.

336. Tyler JS, Boothroyd JC. The C-terminus of *Toxoplasma* RON2 provides the crucial link between AMA1 and the host-associated invasion complex. Plos Pathogens 2011; 7: e1001282.

337. He L, Fan L, Hu J, et al. Characterisation of a *Babesia orientalis* apical membrane antigen, and comparison of its orthologues among selected apicomplexans. Ticks Tick Borne Dis 2015; 6(3): 290-296.

338. Moreau E, Bonsergent C, Al Dybiat I, et al. *Babesia divergens* apical membrane antigen-1 (BdAMA-1): A poorly polymorphic protein that induces a weak and late immune response. Exp Parasitol 2015; 155: 40-45.

339. Salama AA, Terkawi MA, Kawai S, et al. Specific antibody to a conserved region of *Babesia* apical membrane antigen-1 inhibited the invasion of *B. bovis* into the erythrocyte. Exp Parasitol 2013; 135(3): 623-628.

340. Montero E, Rodriguez M, Oksov Y, Lobo CA. *Babesia divergens* apical membrane antigen 1 and its interaction with the human red blood cell. Infect Immun 2009; 77(11): 4783-4793.

341. Hodder AN, Crewther PE, Matthew ML, et al. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. J Biol Chem 1996; 271: 29446-29452.

342. Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F, Blackman MJ. An inhibitory antibody

blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. PLoS Pathog 2009; 5: e1000273.

343. Richard D, MacRaild CA, Riglar DT, et al. Interaction between *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. J Biol Chem 2010; 285: 14815-14822.

344. Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathog 2005; 1: e17.

345. Besteiro S, Michelin A, Poncet J, Dubremetz JF, Lebrun M. Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. PLoS Pathog 2009; 5: e1000309.

346. Lebrun M, Michelin A, El Hajj H, et al. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. Cell Microbiol 2005; 7: 1823-1833.

347. Straub KW, Cheng SJ, Sohn CS, Bradley PJ. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. Cell Microbiol 2009; 11: 590-603.

348. Lamarque M, Besteiro S, Papoin J, et al. The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by Apicomplexan parasites. Plos Pathogens 2011; 7: e1001276.

349. Tyler JS, Treeck M, Boothroyd JC. Focus on the ringleader: the role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. Trends Parasitol 2011; 27(9): 410-420.

350. Donahue CG, Carruthers VB, Gilk SD, Ward GE. The *Toxoplasma* homolog of *Plasmodium* apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels. Mol Biochem Parasitol 2000; 111: 15-30.

351. Howell SA, Hackett F, Jongco AM, et al. Distinct mechanisms govern proteolytic shedding of a key invasion protein in apicomplexan pathogens. Mol Microbiol 2005; 57: 1342-1356.

352. Boyle MJ, Wilson DW, Richards JS, et al. Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107: 14378–14383.

353. Hu K, Johnson J, Florens L, et al. Cytoskeletal components of an invasion machine-the apical complex of *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog 2006; 2: e13.

354. Tran JQ, de Leon JC, Li C, et al. RNG1 is a late marker of the apical polar ring in *Toxoplasma gondii*. Cytoskeleton (Hoboken) 2010; 67: 586-598.

355. Mitchell GH, Thomas AW, Margos G, Dluzewski AR, Bannister LH. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. Infect Immun 2004; 72: 154-158.

356. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell 2006; 124: 755-766.

357. Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J, et al. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. J Cell Biol 1978; 77: 72-82.

358. Kimata I, Tanabe K. Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. J Cell Sci 1987; 88(Pt 2): 231-239.

359. Singh S, Alam MM, Pal-Bhowmick I, Brzostowski JA, Chitnis CE. Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. Plos Pathog 2010; 6: e1000746.

360. Kessler H, Herm-Götz A, Hegge S, et al. Microneme protein 8-a new essential invasion factor in *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci 2008; 121: 947-956.

361. Di Cristina M, Spaccapelo R, Soldati D, Bistoni F, Crisanti A. Two conserved amino acid motifs mediate protein targeting to the micronemes of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. Mol Cell Biol 2000; 20: 7332-7341.

362. Santos JM, Ferguson DJ, Blackman MJ, Soldati-Favre D. Intramembrane cleavage of AMA1 triggers *Toxoplasma* to switch from an invasive to a replicative mode. Science 2010; 331: 473-477.

363. Sultan AA, Thathy V, Frevert U, et al. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. Cell 1997; 90: 511-522.

364. Huynh MH, Carruthers VB. *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. PLoS Pathog 2006; 2: e84.

365. Riglar DT, Richard D, Wilson DW, et al. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. Cell Host and Microbe 2011; 9: 9-20.

366. Chesne-Seck ML, Pizarro J, Vulliez-Le Normand B, et al. Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites. Mol Biochem Parasitol 2005; 144: 55-67.

367. Kocken CH, van der Wel AM, Dubbeld MA, et al. Precise timing of expression of a *Plasmodium falciparum*-derived transgene in *Plasmodium berghei* is a critical determinant of subsequent subcellular localization. J Biol Chem 1998; 273: 15119-15124.

368. Proellocks NI, Coppel RL, Waller KL. Dissecting the apicomplexan rhoptry neck proteins. Trends Parasitol 2010; 26: 297-304.

369. Kearse M, Moir R, Wilson A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 2012; 28(12): 1647-1649.

370. WEB_4 (2016). BLAST. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (04.03.2015).

371. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol 2013; 30(12): 2725-2729.

372. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol 2008; 25(7): 1253-1256.

373. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 2001; 17(8): 754-755.

374. WEB_5 (2016). ORF Finder. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/ (08.04.2015).

375. Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali CH, et al. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. Electrophoresis 1993; 14: 1023-1031.

376. Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis JE. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. Electrophoresis 1994; 15: 529-539.

377. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM (ed), The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press, 2005.

378. Filatov DA. Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. Bioinformatics 2009; 25: 3189-3190.

379. WEB_6 (2016). Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0. http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=indexweb (10.08.2015).

380. WEB_7 (2016). Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. http://www.jmol.org/ (15.08.2015).

381. WEB_8. (2016). Primer BLAST. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ (05.08.2015).

382. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.

383. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3 rd ed), Volume 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

384. Jack RM, Ward PA. Mechanisms of entry of plasmodia and babesia into red cells. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press, 1981.

385. Spielman A, Wilson ML, Levine JF, Piesman J. Ecology of Ixodes dammini-borne human babesiosis and Lyme disease. Annu Rev Entomol 1985: 30; 439-460.

386. Deans JA, Thomas AW, Alderson T, Cohen S. Biosynthesis of a putative protective *Plasmodium knowlesi* merozoite antigen. Mol Biochem Parasitol 1984; 11: 189-204.

387. Carruthers V, Boothroyd JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. Curr Opin Microbiol 2007; 10: 83-89.

388. Preiser P, Kaviratne M, Khan S, Bannister L, Jarra W. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. Microbes Infect 2000; 2: 1461-1477.

389. Hodder AN, Crewther PE, Anders RF. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. Infect Immun 2001; 69: 3286-3294.

390. Pizarro J, Vulliez-Le Normand B, Chesne-Seck ML, et al. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. Science 2005; 308: 408-411.

391. Dautu G, Munyaka B, Carmen G, et al. *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with genes encoding antigens MIC2, M2AP, AMA1 and BAG1 and evaluation of their immunogenic potential. Exp Parasitol 2007; 116: 273-282.

392. Collins WE, Pye D, Crewther PE, et al. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. Am J Trop Med Hyg 1994; 51: 711-719.

393. Crewther PE, Matthew ML, Flegg RH, Anders RF. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. Infect Immun 1996; 64: 3310-3317.

394. Anders RF, Crewther PE, Edwards S, et al. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. Vaccine 1998; 16: 240-247.

395. Burns JM Jr, Flaherty PR, Romero MM, Weidanz WP. Immunization against *Plasmodium chabaudi* malaria using combined formulations of apical membrane antigen-1 and merozoite surface protein-1. Vaccine 2003; 21(17-18): 1843-1852.

396. Salvatore D, Hodder AN, Zeng W, et al. Identification of antigenically active tryptic fragments of apical membrane antigen-1 (AMA1) of *Plasmodium chabaudi* malaria: strategies for assembly of immunologically active peptides. Vaccine 2002; 20: 3477-3484.

397. Xu H, Hodder AN, Yan H, et al. $CD4^+$ T cells acting independently of antibody contribute to protective immunity to *Plasmodium chabaudi* infection after apical membrane antigen 1 immunization. J Immunol 2000; 165: 389-396

398. Burns JM Jr, Flaherty PR, Nanavati P, Weidanz WP. Protection against *Plasmodium chabaudi* malaria induced by immunization with apical membrane antigen 1 and merozoite surface protein 1 in the absence of gamma interferon or interleukin-4. Infect Immun 2004; 72: 5605-5612.

399. Kocken CH, Dubbeld MA, Van Der Wel A, et al. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. Infect. Immun 1999; 67: 43-49.

400. Narum DL, Ogun SA, Thomas AW, Holder AA. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection. Infect Immun 2000; 68: 2899-2906.

401. Bhardwaj D, Hora B, Singh N, et al. Immunogenicity and protective efficacy of three DNA vaccines encoding pre-erythrocytic- and erythrocytic-stage antigens of *Plasmodium cynomolgi* in rhesus monkeys. FEMS Immunol Med Microbiol 2002; 34: 33-43.

402. Stowers AW, Kennedy MC, Keegan BP, et al. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. Infect Immun 2002; 70: 6961-6967.

403. Salazar LM, Alba MP, Torres MH, et al. Protection against experimental malaria associated with AMA-1 peptide analogue structures. FEBS Lett 2002; 527: 95-100.

404. Ellis RD, Sagara I, Doumbo O, Wu Y. Blood stage vaccines for *Plasmodium falciparum*: current status and the way forward. Hum Vaccin 2010; 6(8): 627-634.

405. Poukchanski A, Fritz HM, Tonkin ML, et al. *Toxoplasma gondii* sporozoites invade host cells using two novel paralogues of RON2 and AMA1. Plos One 2013; 8(8): e70637.

406. Lamarque MH, Roques M, Kong-Hap M, et al. Plasticity and redundancy among AMA-RON pairs ensure host cell entry of *Toxoplasma parasites*. Nat Commun 2014; 5: 4098.

407. Parker ML, Boulanger MJ. An extended surface loop on *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen 1 (AMA1) governs ligand binding selectivity. Plos One 2015; 10(5): e0126206.

408. Lagal V, Dinis M, Cannella D, et al. AMA1-deficient *Toxoplasma gondii* parasites transiently colonize mice and trigger an innate immune response that leads to long-lasting protective immunity. Infect Immun 2015; 83(6): 2475-2486.

409. Zhang TE, Yin LT, Li RH, et al. Protective immunity induced by peptides of AMA1, RON2 and RON4 containing T-and B-cell epitopes via an intranasal route against toxoplasmosis in mice. Parasit Vectors 2015; 8: 15.

410. Zhang H, Compaore MK, Lee EG, et al. Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, and the anti-NcAMA1 antibody inhibits host cell invasion by both parasites. Mol Biochem Parasitol 2007; 151(2): 205-212.

411. Zhang H, Nishikawa Y, Yamagishi J, et al. *Neospora caninum*: application of apical membrane antigen 1 encapsulated in the oligomannose-coated liposomes for reduction of offspring mortality from infection in BALB/c mice. Exp Parasitol 2010; 125(2): 130-136.

412. Tonkin ML, Crawford J, Lebrun ML, Boulanger MJ. *Babesia divergens* and *Neospora caninum* apical membrane antigen 1 structures reveal selectivity and plasticity in apicomplexan parasite host cell invasion. Protein Sci 2013; 22(1): 114-127.

413. Ruff MD. Important parasites in poultry production systems. Vet Parasitol 1999; 84(3-4): 337-347.

414. Vermeulen AN, Schaap DC, Schetters TP. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. Vet Parasitol 2001; 100(1-2): 13-20.

415. Shirley MW, Smith AL, Blake DP. Challenges in the successful control of the avian coccidia. Vaccine 2007; 25(30): 5540-5547.

416. Han HY, Lin JJ, Zhao QP, et al. Identification of differentially expressed genes in early stages of *Eimeria tenella* by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. J Parasitol 2010; 96(1): 95-102.

417. Jiang L, Lin J, Han H, et al. Identification and characterization of *Eimeria tenella* apical membrane antigen-1 (AMA1). Plos One 2012; 7(7): e41115.

418. Lal K, Bromley E, Oakes R, et al. Proteomic comparison of four *Eimeria tenella* life-cycle stages: unsporulated oocyst, sporulated oocyst, sporozoite and second-generation merozoite. Proteomics 2009; 9(19): 4566-4576.

419. Blake DP, Billington KJ, Copestake SL, et al. Genetic mapping identifies novel highly protective antigens for an apicomplexan parasite. PLoS Pathog 2011; 7(2): e1001279.

420. Hoan TD, Thao DT, Gadahi JA, et al. Analysis of humoral immune response and cytokines in chickens vaccinated with *Eimeria brunetti* apical membrane antigen-1 (EbAMA1) DNA vaccine. Exp Parasitol 2014; 144: 65-72.

421. Tonukari NJ. *Theileria parva* apical membrane antigen-1 (AMA-1) shares conserved sequences with apicomplexan homologs. Int J Biotech Mol Biol Res 2010; 1(3): 36-41.

422. Zhou J, Yang J, Zhang G, et al. *Babesia gibsoni*: an apical membrane antigen-1 homologue and its antibody response in theinfected dogs. Exp Parasitol 2006; 114: 329-333.

423. Moitra P, Zheng H, Anantharaman V, et al. Expression, purification, and biological characterization of *Babesia microti* apical membrane antigen 1. Infect Immun 2015; 83(10): 3890-3901.

424. Torina A, Caracappa S. Babesiosis in Italy: an overview. Parassitologia 2007; 49: 23-28.

425. Torina A, Cordaro A, Blanda V, et al. A promising new ELISA diagnostic test for cattle babesiosis based on *Babesia bigemina* Apical Membrane Antigen-1. Vet Ital 2016; 52(1): 63-69.

426. Drew DR, Hodder AN, Wilson DW, et al. Defining the antigenic diversity of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the requirements for a multi-allele vaccine against malaria. Plos One 2012; 7: e51023.

427. Remarque EJ, Roestenberg M, Younis S, et al. Humoral immune responses to a single allele PfAMA1 vaccine in healthy malaria-naive adults. Plos One 2012; 7: e38898.

428. Takala SL, Coulibaly D, Thera M, et al. Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development. Sci Transl Med 2009; 1(2): 2ra5.

429. Gunasekera AM, Wickramarachchi T, Neafsey DE, et al. Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. Mol Biol Evol 2007; 24: 939-947.

430. Rodrigues MHC, Rodrigues KM, Oliveira TR, et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. Int J Parasitol 2005; 35: 185-192.

431. Beghetto E, Nielsen HV, Del Porto P, et al. A combination of antigenic regions of *Toxoplasma gondii* microneme proteins induces protective immunity against oral infection with parasite cysts. J Infect Dis 2005; 191(4): 637-645.

432. Xu L, Bao L, Zhou J, et al. Genomic polymorphism of the pandemic A (H1N1) influenza viruses correlates with viral replication, virulence, and pathogenicity *in vitro* and *in vivo*. Plos One 2011; 6(6): e20698.

433. Ramsey KH, Sigar IM, Schripsema JH, et al. Strain and virulence diversity in the mouse pathogen *Chlamydia muridarum*. Infect Immun 2009; 77(8): 3284-3293.

434. Liu M, Vakharia VN. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. Virology 2004; 330(1): 62-73.

435. Biller L, Schmidt H, Krause E, et al. Comparison of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. Proteomics 2009; 9(17): 4107-4120.

436. Swartz JR. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. Curr Opin Biotechnol 2001; 12: 195-201.

437. Hewitt L, McDonnell JM. Screening and optimizing protein production in *E. coli* methods. Mol Biol 2004; 278: 1-16.

438. Jana S, Deb JK. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 67: 289-298.

439. Peti W, Page R. Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. Protein Expr Purif 2007; 51(1): 1-10.

440. Structural Genomics Consortium; China Structural Genomics Consortium; Northeast Structural Genomics Consortium, Gräslund S, Nordlund P. Protein production and purification. Nat Methods 2008; 5: 135-146.

441. Ofran Y, Margalit H. Proteins of the same fold and unrelated sequences have similar amino acid composition. Proteins 2006; 64(1): 275-279.

442. Howell SA, Withers-Martinez C, Kocken CH, Thomas AW, Blackman MJ. Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. J Biol Chem 2001; 276(33): 31311-31320.

443. Ramos CA, Araújo FR, Alves LC, et al. Genetic conservation of potentially immunogenic proteins among Brazilian isolates of *Babesia bovis*. Vet Parasitol 2012; 187(3-4): 548-552.

444. Sivakumar T, Okubo K, Igarashi I, et al. Genetic diversity of merozoite surface antigens in *Babesia bovis* detected from Sri Lankan cattle. Infect Genet Evol 2013; 19: 134-140.

445. Yoshinari T, Sivakumar T, Asada M, et al. A PCR based survey of *Babesia ovata* in cattle from various Asian, African and South American countries. J Vet Med Sci 2013; 75(2): 211-214.

446. Sivakumar T, Tattiyapong M, Okubo K, et al. PCR detection of *Babesia ovata* from questing ticks in Japan. Ticks Tick Borne Dis 2014; 5(3): 305-310.

447. Niu Q, Liu Z, Yu P, et al. Genetic characterization and molecular survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Babesia ovata* in cattle, dairy cattle and yaks in China. Parasit Vectors 2015; 8: 518.

448. Elsify A, Sivakumar T, Nayel M, et al. An epidemiological survey of bovine *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle, buffaloes, and sheep in Egypt. Parasitol Int 2015; 64(1): 79-85.

449. Sivakumar T, Altangerel K, Battsetseg B, et al. Genetic detection of *Babesia bigemina* from Mongolian cattle using apical membrane antigen-1 gene-based PCR assay. Vet Parasitol 2012; 187(1-2): 17-22.

450. Sivakumar T, Kothalawala H, Abeyratne SA, et al. A PCR-based survey of selected *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle in Sri Lanka. Vet Parasitol 2012; 190(1-2): 263-267.

451. Sivakumar T, Lan DT, Long PT, et al. PCR detection and genetic diversity of bovine hemoprotozoan parasites in Vietnam. J Vet Med Sci 2013; 75(11): 1455-1462.

452. Ybañez AP, Sivakumar T, Ybañez RH, et al. Molecular survey of bovine vector-borne pathogens in Cebu, Philippines. Vet Parasitol 2013; 196(1-2): 13-20.

453. Sivakumar T, Tattiyapong M, Fukushi S, et al. Genetic characterization of *Babesia* and *Theileria* parasites in water buffaloes in Sri Lanka. Vet Parasitol 2014; 200(1-2): 24-30.

454. Ochirkhuu N, Konnai S, Mingala CN, et al. Molecular epidemiological survey and genetic analysis of vector-borne infections of cattle in Luzon Island, the Philippines. Vet Parasitol 2015; 212(3-4): 161-167.

455. Bawm S, Htun LL, Maw NN, et al. Molecular survey of *Babesia* infections in cattle from different areas of Myanmar. Ticks Tick Borne Dis 2016; 7(1): 204-207.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Arif ÇİLOĞLU

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Doğum Tarihi ve Yeri: 18 Ekim 1987, Bursa

Medeni Durumu: Bekar

Tel: +90 539 551 35 31

email: arifciloglu@erciyes.edu.tr

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, 38039 Melikgazi/ KAYSERİ-TÜRKİYE

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lise	Celal Toraman Anadolu Lisesi/Burhaniye	2005
Lisans	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2010

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2011-	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce