



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI  
VCR- DR- 2010- VTF06006

***Theileria annulata*'nın TANISINDA SEROLOJİK (İndirekt ELISA)  
ve MOLEKÜLER (PZR, çoklu PZR ve LAMP) YÖNTEMLERİN  
GELİŞTİRİLMESİ**

**HAZIRLAYAN: Veteriner Hekim Hüseyin Bilgin BİLGİÇ**

**DANIŞMAN: Doç. Dr. Tülin KARAGENÇ**

**AYDIN- 2010**

## ÖNSÖZ

Türkiye'nin bulunduğu coğrafik alan ve iklimsel koşullar, ülkemizi hayvan hastalıkları açısından bir risk bölgesi haline getirmektedir. Bu hastalıklar içerisinde yer alan kenelerle bulaşan hastalıklarda, Türkiye'deki hayvanlarda önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Apikompleksa anacındaki protozoal bir parazit olan *Theileria annulata* tarafından oluşturulan tropikal theileriosis yada Akdeniz Sahil Humması sığırların ekonomik açıdan önemli hastalıklarından biridir. Hastalık etkeni *Hyalomma* soyuna bağlı ixodid keneler tarafından taşınmakta ve kan emme esnasında omurgalı konak olan sığırlara nakledilmektedir. Hastalık, Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Hindistan ve ülkemizide içine alan Orta Doğu ile Asya'da yaygın olarak görülmekte ve bölgedeki sığırları tehdit etmektedir. Hastalık ile direkt ilişkili olarak hayvanlarda görülebilecek ölüm ve verim düşüklüğü ile indirekt ilişkili olan işletmelerdeki veteriner tanı ve tedavi giderleri ile kene mücadelesi için yapılan masraflar üreticiler ve ülke ekonomisi açısından önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Hastalığın kontrolünde en sık olarak kullanılan yöntem attenüye hücre kültürleri ile aşılama, ancak bağışık hayvanlarda gelişen MHC (doku uyşum kompleksi) sınıf I aracılı sitotoksik T hücre sel yanıt hem farklı suşlar arasında hem de klonlanmış parazit popülasyonlarında heterojenite göstermektedir. Hem hastalığa karşı kontrol programlarının oluşturulmasında hemde risk haritasının belirlenmesinde hastalığın yaygınlığı, hastalığa neden olan parazit popülasyonlarındaki genetik çeşitlilik, hastalığı taşıyan kenelerin mevsimsel aktiviteleri, hayvan hareketleri çok iyi belirlenmelidir. Bu amaçla yapılacak olan epidemiyolojik çalışmalarda hastalığın duyarlı, özgül ve hızlı olarak teşhisine olanak verecek yöntemlerin kullanılması önem taşımaktadır. Tropikal theileriosis' in teşhisinde kullanılan mikrobik yöntemler akut olgularda iyi sonuç verirken, hastalığı atlatan hayvanların teşhisinde yetersiz kalmaktadır. Mikroskobik yöntemlerden kaynaklanan dezavantajların önüne geçebilmek için, hastalığa yakalanan hayvanların tanısında serolojik ve moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Hastalığın teşhisinde, serolojik yöntemler arasında yer alan enzim bağımlı immunosorbent testi (ELISA) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi moleküler teknikler giderek artan oranda kullanım alanı bulmuştur. Parazitin omurgalı konakta gelişen farklı yaşam dönemlerine özgü proteinler kullanılarak yapılan ELISA ile aşılı ve/veya doğal enfekte hayvanların ayırımının yapılabilmesi o bölgede görülen hastalığın sığırlardaki mevcut durumu hakkında daha ayrıntılı bilgi edinilmesine yardımcı olacaktır. Bunun yanında kullanılacak parazit DNA' sının tespitine dayalı tekli ve çoklu PZR, lopp aracılı izotermal çoğaltma (LAMP) gibi moleküler testler, hastalığa neden olan etkenlerin sığırlarda eş zamanlı olarak görülebilecek diğer kan parazitlerinden ayırımına veya tüm etkenlerin eş zamanlı olarak belirlenmesine olanak verecektir. Moleküler ve serolojik testlerin bir arada kullanılması hastalığa bağlı hayvanlarda oluşan verim kayıplarının giderilmesine yönelik uygulanacak kontrol programlarının geliştirilmesinde kullanılacak verilerin daha ayrıntılı şekilde elde edilmesini sağlayacaktır.

Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Programı (BAP) ve Wellcome Trust (Ref 075820/A/04/Z) tarafından desteklenen bu çalışmada, *Theileria annulata*'nın ELISA ve moleküler yöntemler (tekli ve çoklu PZR, LAMP gibi) ile teşhisinde kullanılabilecek yeni yöntemler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Konuların daha anlaşılabilir olması ve karışmaması için tez dört ana bölüm altında toplanmıştır. Birinci bölümde sadece genel bilgi verilmiş olup seroloji ve moleküler kısmı oluşturan ikinci ve üçüncü bölümlerde kendi içerisinde belirlenen amaçlar bulunmaktadır. Belirtilen amaçların gerçekleştirilmesinde kullanılan yöntem, elde edilen sonuçlar ve tartışma her amaç için ayrı olacak şekilde anlatılmış, son bölümde ise sonuç ve öneriler yer almıştır.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ÖNSÖZ</b>	i
<b>İÇİNDEKİLER</b>	ii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	viii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	xi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xiii
<b>RESİMLER DİZİNİ</b>	xvi
<b>BÖLÜM 1. GİRİŞ</b>	
1.1. Genel Bilgi	1
1.1.1. Önemli Theileria Türleri	1
1.2. <i>Theileria annulata</i> 'nın Yaşam Çemberi	7
1.2.1. Omurgalı Ara Konaktaki (Sığır) Dönem	7
1.2.2. Omurgasız Ara Konaktaki (Vektör) Dönem	13
1.3. <i>Theileria annulata</i> 'nın genomu	15
1.4. Tropikal Theileriosis de Klinik Bulgular ve Patogenez	15
1.5. Tropikal Theileriosis de Bağışıklık	17
1.5.1. Doğal Bağışık Yanıt	18
1.5.2. Edinsel Bağışık Yanıt	21
1.5.2.1. Hücresel Bağışıklık	21
1.5.2.2. Humoral Bağışıklık	23
1.6. Türkiye' de Tropikal Theileriosis'in Epidemiyolojisi	24
1.7. Tropikal Theileriosis'in Tanısı ve Tedavisi	32
1.7.1. Klinik Tanı	32
1.7.2. Antikor veya Antijen Kullanılarak Yapılan Serolojik Tanı	33
1.7.3. Moleküler Tanı	35
1.7.4. Tedavi	37
1.8. Tropikal Theileriosis de Korunma ve Kontrol Yöntemleri	37
1.8.1. Direçli Irkların Kullanılması	37
1.8.2. Vektör Mücadelesi	38
1.8.3. Kemoterapi	39
1.8.4. Aşılama	39
1.8.4.1. Kan Transfüzyonu ile Aşılama	39
1.8.4.2. Enfeksiyon ve Tedavi Yöntemi	40

1.8.4.3. Hücre Kültürü Aşıları	41
1.8.4.4. Sub – unit Aşılar	44
<b>BÖLÜM 2. ELISA İLE SEROLOJİK TEŞHİSTE KULLANILMAK ÜZERE</b>	
<b>PROTEİNLERİN BELİRLENMESİ</b>	
2.1. Genel Bilgi	53
2.A. Biyoinformatik Yöntemler Kullanılarak <i>T. annulata</i> 'nın Makroşizont Dönemine Özgü Proteinlerin Belirlenmesi, Bu Proteinlerin Klonlanıp Üretilmesi ve Proteinlere Karşı Bağışık Yanıtın Deneysel Enfekte Hayvan Serumları Kullanılarak Western Blot Metodu ile İncelenmesi	56
2.A.1. Gereç ve Yöntem	60
2.A.1.1. Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali ve Protein Ekstraktlarının Hazırlanması	60
2.A.1.2. <i>Theileria annulata</i> 'nın Makroşizont Dönemine Özgü Proteinlerin Biyoinformatik Yöntemle Belirlenmesi	62
2.A.1.3. Belirlenen Proteinleri Kodlayan Gen Bölgelerinin Klonlanması	66
2.A.1.4. Klonlanan Gen Bölgelerince Kodlanan Proteinlerin Üretilerek Saflaştırılması	72
2.A.1.5. Proteinlerin SDS Polyakrilamid Gel Elektroforezi (SDS–PAGE) ve Western Blot	74
2.A.1.6. D7 Hücre Kültürlerinin Alt Hücresele Fraksiyonlarına Ayrılması	76
2.A.2. Bulgular	78
2.A.2.1. Biyoinformatik Yöntemle Belirlenen <i>T.annulata</i> 'nın Makroşizont Dönemine Özgü Proteinler	78
2.A.2.2. Rekombinant Proteinler ve <i>T. annulata</i> 'nın Farklı İzolatıları ile Elde Edilen Western Blot Sonuçları	82
2.A.2.3. D7 Hücre Kültürlerinin Alt Hücresele Fraksiyonları	93
2.A.3. Tartışma	95
2.B. TaSP Molekülünün İmmunodominant Makroşizont Antijeni Olup Olmadığının Belirlenmesi ve İmmunodominant Bantların Tanımlanması	107
2.B.1. Gereç ve Yöntem	114
2.B.1.1. Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali ve	



Western Blotlama	114
2.B.1.2. Bağışık Serumların TaSP ile Bloklanması ve Western Blotlama	114
2.B.1.3. Bağışık Serum ile İmmunopresipitasyon ve Proteomiks Analizleri	115
2.B.2. Bulgular	119
2.B.2.1. Bağışık Serumlar ve Anti-TaSP Antikoru ile Elde Edilen Western Blotlama Sonuçları	119
2.B.2.2. Bağışık Serumların TaSP ile Bloklanması	128
2.B.2.3. İmmunopresipitasyon (IP) ve Proteomiks Analiz Sonuçları	130
2.B.2.4. Klonlanan Proteinlerin Dizilim ve Western Blot Sonuçları	142
2.B.3. Tartışma	152
2.C. TaSP, Ta9 ve Ta9.4 Rekombinant Antijenleri Kullanılarak İndirek ELISA Testlerinin Geliştirilmesi	160
2.C.1. Gereç ve Yöntem	164
2.C.1.1. Enzim İşaretli İmmunosorbant (ELISA) Testi	164
2.C.1.2. ELISA Testinin Standardizasyonu	165
2.C.1.3. ELISA Testinin Duyarlılık, Özgüllük ve Kesim (cut-off) Noktasının Belirlenmesi	166
2.C.1.4. İndirek Floresan Antikor (IFA) Testi	167
2.C.1.5. Saha Serum Örnekleri	168
2.C.2. Bulgular	169
2.C.2.1. ELISA Testinde Kullanılan Reaktiflerin Standardizasyon ve Optimizasyonu	169
2.C.2.2. TaSP, Ta9 ve Ta9.4 Antijenlerinin Duyarlılık ve Özgüllükleri	183
2.C.2.4. Saha Serum Örneklerinin IFA ve ELISA Testi Sonuçları	188
2.C.3. Tartışma	190

### **BÖLÜM 3. TROPİKAL THEİLERİOSİS'İN TEŞHİSİNDE MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİNİN KULLANIMI**

3.1. Genel Bilgi	202
3.A. <i>Theileria annulata</i> 'nın Hasta ve Taşıyıcı Hayvanlarda PZR Yöntemi ile Teşhisi	204
3.A.1. Gereç ve Yöntem	206
3.A.1.1. Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali	206
3.A.1.2. Deneysel enfeksiyon	208
3.A.1.3. <i>Sfi</i> , <i>Tar</i> , <i>SVSP</i> , Sitokrom b ve Mero I Genlerinin PZR ile Çoğaltılmasında Kullanılmak Amacıyla Primerlerin Tasarlanması	209
3.A.1.4. PZR ile Tasarlanan Primerlerin Değerlendirilmesi	209
3.A.1.5. RLB hibridizasyonu ve duyarlılığın belirlenmesi	210
3.A.1.6. Seçilen Primer Çiftleri Kullanılarak Çoğaltılan PZR Ürünlerinin Sekans Analizleri İçin Klonlanması	214
3.A.2. Bulgular	218
3.A.2.1. <i>Sfi</i> , <i>Tar</i> , <i>SVSP</i> , Sitokrom b ve Mero I Genlerinin PZR ile Çoğaltılmasında Kullanılmak Amacıyla Tasarlanan Primerler ve PZR'u ile Özgüllüklerinin Belirlenmesi	218
3.A.2.2. <i>Ctyo b1</i> , <i>Mero I</i> , <i>Sfi</i> set 2, <i>Tams</i> ve <i>ssu rRNA</i> Primer Çiftlerinin Duyarlılıklarının Agaroz Gel Elektroforezi ile Karşılaştırılması	231
3.A.2.3. <i>Cyto b1</i> ile RLB F/R Primer Çiftlerinin Duyarlılıklarının RLB Hibridizasyonu ile Karşılaştırılması	233
3.A.3. Tartışma	237
3.B. <i>Theileria annulata</i> , <i>Babesia bovis</i> ve <i>Anaplasma marginale</i> Türlerinin Sığırlarda Çoklu (Multipleks) PZR Yöntemi ile Eş Zamanlı Teşhisi	243
3.B.1. Gereç ve Yöntem	246
3.B.1.1. Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali	246
3.B.1.2. Çalışmada Kullanılan Gen Bölgeleri ve GenBank Ulaşım Numaraları	246
3.B.1.2. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Tasarlanması ve Bunlara ait Nükleotid Dizilimleri	247
3.B.1.3. Tasarlanan Primerlerin Tekli ve multipleks PZR ile Değerlendirilmesi	250

3.B.1.4. Tekli ve multipleks PZR' larının Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi	252
3.B.1.5. Multipleks PZR yöntemi ile Elde Edilen Ürünlerin Sekans Analizleri İçin Klonlanması	252
3.B.2. Bulgular	253
3.B.2.1. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Tasarlanması ve Bunlara ait Nükleotid Dizimleri	253
3.B.2.2. Tasarlanan Primer Çiftlerinin Tekli PZR ile Özgüllüklerinin Değerlendirilmesi	262
3.B.2.3. Tekli ve Multipleks PZR'nun Duyarlılıkları	272
3.B.2.4. Saha Şartlarından Toplanan Kan Örneklerinin Değerlendirilmesi	276
3.B.2.5. Multipleks PZR ile Çoğaltılan Ürünlerin Dizilim Sonuçları	278
3.B.3. Tartışma	280
3.C. <i>Theileria annulata</i> DNA'sının Loop Aracılı İzotermal Yöntemle (LAMP) Çoğaltılması	288
3.C.1. Gereç ve Yöntem	294
3.C.1.1. Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali	294
3.C.1.2. LAMP Yönteminin Temel Çalışma Esası ve Kullanılan Primerlerin Özellikleri	294
3.C.1.3. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Tasarlanması ve Bunlara ait Nükleotid Dizimleri	301
3.C.1.4. Tasarlanan Primerlerin LAMP Yöntemi ile Değerlendirilmesi	303
3.C.1.5. PZR ile LAMP Yönteminin Duyarlılığının Karşılaştırılması	305
3.C.1.6. LAMP Ürünlerinin İncelenmesi	305
3.C.1.7. Oluşan LAMP Ürünlerinin EcoR I Restriksiyon Enzimi Kullanılarak Kesilmesi	306
3.C.1.8. F3/B3 Primer Çifti Kullanılarak Yapılan PZR Ürünlerinin Sekans Analizleri İçin Klonlanması	306

3.C.1.9. LAMP yönteminin Saha Şartlarında Denenmesi	307
3.C.2. Bulgular	309
3.C.2.1. Tasarlanan LAMP Primerleri ile Elde Edilen Sonuçlar	309
3.C.2.2. PZR ve LAMP Yönteminin Duyarlılıklarının Karşılaştırılması	311
3.C.2.3. Sekans Analiz Sonuçları	315
3.C.2.4. Oluşan LAMP Ürünlerinin EcoR I Restriksiyon Enzimi Kullanılarak Kesilmesi	317
3.C.2.5. <i>Babesia bovis</i> 'in LAMP Yöntemi ile Teşhisinde Kullanılan Primerlerle Elde Edilen Sonuçlar	317
3.C.2.6. LAMP yönteminin Saha Şartlarında Kullanılabilirliği	317
3.C.3. Tartışma	322
<b>BÖLÜM 4. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	326
<b>ÖZET</b>	330
<b>SUMMARY</b>	333
<b>KAYNAKLAR</b>	336
<b>TEŞEKKÜR</b>	368
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	369

## SİMGELER VE KISALTMALAR

APS:	Amonyum Persulfate
BCIP:	5-bromo-4-kloro-3-indolin-fosfat
bp:	Baz çifti
BIP:	Geri Yönlü İç Primer
BSA:	Sığır Serum Albümin
$\beta$ -tubulin:	Beta tubulin geni
cHDA :	Çember helicase tabanlı çoğaltma
dN/Ds:	Ortolog Genler Arasında Sinonim ve Sinonim Olmayan Değişimlerin Oranı
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DnaSP:	Yüzde nükleotid çeşitliliğin belirlenmesi için yapılan bilgisayar programı
dNTP :	Deoksiribonükleosid-trifosfatların
ELISA:	Enzim İşaretli İmmunosorbant Testi
EST:	Eksprese Edilen Sekans İşaretleyicileri (Expressed Sequence Tag)
fmol:	Femtomol
FIP:	İleri Yönlü İç Primer
fg:	Femtogram
FTA:	FTA kartları toplanan kan örneklerinde bulunan patojen DNA' ların kolay ve güvenli şekilde saklanıp, nakledilmesinde kullanılan bir yöntemdir
For:	ileri yönlü (forward) primer
F2c:	Komplementer Bölge
F3:	Dış Primer
F3c:	Komplementer Bölge
GSS:	Genom Dizilim Belirleme (Genome Sequence Survey)
GBS:	B grubu Streptokoklar
GC:	G; guanin, C; sitozin
GPI:	Glikofosfotidilinoitol
HDA :	Helicase tabanlı çoğaltma
HSP70:	Isı şok proteini 70
IFAT:	İndirekt Floresan Antikor
IHF:	İntegrasyon Konak Faktör Proteini
Int:	Bakteriofaj Lambda İntegraz
IKK:	I $\kappa$ B kinaz
IgG:	Floresan ile işaretli Antibovine

IMDA :	İzotermal çoklu yer değiştirme yoluyla çoğaltma
kb:	Kilobaz
kDa:	Kilo Dalton
LAMP:	Loop Aracılı İzotermal Çoğaltma (Loop-mediated isothermal Amplification)
Mero I:	<i>T.sergenti</i> ve <i>T.buffeli</i> türlerinde bulunan 23 kDa piroplazm yüzey proteini benzeri proteinin kodlayan gen (TA13810, GeneDB)
mg:	Miligram
MgCl <sub>2</sub> :	Magnezyum klorür
ml:	Mililitre
mM:	Milimolar
µl:	Mikrolitre
µg:	Mikrogram
MHC sınıf I:	Doku uyuşum kompleksi sınıf I
MHC sınıf II:	Doku uyuşum kompleksi sınıf II
mPZR:	Multipleks (çoklu) PZR
<i>m</i> sp:	major yüzey proteini
mtDNA:	Mitokondriyal DNA
NASBA :	Nükleik asit dizilim tabanlı çoğaltma
NBT:	Nitroblue Tetrazolium
ng:	Nanogram
ORF:	Protein kodlayan alan (open reading frame)
UV:	Ultraviyole
PEST motifi:	Proline (P), glutamik asit (E), serine (S) ile threonine (T) amino asitlerinden oluşan ve sentezlenen polipeptidlerde hızlı protein degradasyonu için signal peptid görevini gören
Rev:	Geri yönlü (reverse) primer
RFLP:	Restriksiyon enzimi ile kesilen bölgelerinin boy farklılıklarının
Ribo-SPIA:	RNA' nın tek primerli izotermal çoğaltma
RT:	Ters yönlü transkripsiyon
rRNA:	Ribozomal RNA
RLB:	Reverse Line Blot
PZR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
SDA :	Zincir yerdeğiştirme yoluyla çoğaltma
SDS–PAGE:	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

<i>Sfi</i> :	Sub – telomerik çoklu kopyaya sahip gen ailesi
SMART :	RNA'nın signal aracılı çoğaltılması
SNP:	Tek nükleotid farklılığı
SPIA :	Tek primerli izotermal çoğaltma
SP:	signal dizilim (signal peptid)
SPAG-1:	<i>Theileria annulata</i> sporozoit yüzey antijeni
ssu rRNA:	Ribozomal RNA küçük alt ünitesi
SVSP:	<i>Theileria</i> ' ya özgü subtelomerik salgısal yapıları kodlayan gen ailesi
Tamr-1:	<i>Theileria annulata</i> rhoptri Antijeni
Tams-1:	<i>Theileria annulata</i> merozoit / piroplasm yüzey antijeni
TaSP:	<i>Theileria annulata</i> yüzey proteini
TaD :	<i>Theileria annulata</i> şizont yüzey antijeni
TaSE:	<i>Theileria annulata</i> şizont proteini
TamtHSP70:	<i>Theileria annulata</i> mitokondriyal HSP70
<i>Tar</i> :	<i>Theileria parva</i> genomunda bulunan <i>Tpr</i> genlerinin <i>T.annulata</i> genomundaki ortologları
<i>Taq</i> :	<i>Thermus aquaticus</i>
Ta9:	TA15705 (GeneDB) geni tarafından kodlanan protein
Ta9.1:	TA15685 (GeneDB) geni tarafından kodlanan protein
Ta9.2:	TA15690 (GeneDB) geni tarafından kodlanan protein
Ta9.3:	TA15695 (GeneDB) geni tarafından kodlanan protein
Ta9.4:	TA15710 (GeneDB) geni tarafından kodlanan protein
TMA :	Transkripsiyon aracılı çoğaltma
<i>Tpr</i> :	<i>Theileria parva</i> genomunda bulunan çoklu kopyaya sahip gen ailesi
TEMED:	tetra-metil-1,2-diaminoethan
TMD :	Transmembran Domain
TNF- $\alpha$ :	Tümör nekrozis faktör alfa
T7 RNAP:	T7 RNA Polimeraz
RCA :	Çember dönme çoğaltması
VESA:	Değişken eritrosit yüzey antijeni
Xis:	Eksiyonaz
3SR :	Kendinden katlamalı dizilim kopyalanması

## ÇİZELGELER

		Sayfa
Çizelge 1.1.	Evcil ruminatlarda hastalık oluşturan <i>Theileria</i> türleri	2
Çizelge 2.A.1.	Protein ekstraktlarının hazırlanmasında kullanılan parazit stoklarının türü ve orijinini	61
Çizelge 2.A.2.	<i>Theileria annulata</i> ve <i>T.parva</i> genomunda bulunan protein kodlayan genlerin kompozisyonu	64
Çizelge 2. A.3.	Biyoinformatik yöntemlerle belirlenen proteinlerin klonlamasında tasarlanan primer çiftleri ve bunların dizilimleri	68
Çizelge 2.A.4.	Biyoinformatik yolla SP, TMD, GPI anchor, EST verileri ve dN/dS oranlarına göre belirlenen proteinler	81
Çizelge 2.A.5.	Üretilen rekombinant proteinler kullanılarak elde edilen Western blot sonuçları	86
Çizelge 2.B.1.	IP sonucunda SDS–PAGE’den elde edilen protein bantının mass spektrofotometrik yolla peptid dizilerinin Mascot tarama sonuçları	135
Çizelge 2.B.2.	Ta9 paralog gen ailesinde kodlanan proteinlerin biyoinformatik inceleme sonuçları	139
Çizelge 2.C.1.	Standardize edilmiş ELISA’larda kullanılan optimal antijen ve serum dilüsyonları	169
Çizelge 2.C.2.	<i>Theileria annulata</i> sporozoitleri veya makroşizont hücre kültürleri ile enfekte hayvanlarda TaSP, Ta9 ve Ta9.4 ELISA testlerinin belirlenen yüzde (%) duyarlılıkları	183
Çizelge 2.C.3.	TaSP, Ta9 ve Ta9.4 ELISA ve IFA testleri ile 355 saha örneğinde belirlenen <i>T. annulata</i> enfeksiyonunun karşılaştırılması	189
Çizelge 3.A.1.	Tezde kullanılan parazit stoklarının türü ve orijinini	207
Çizelge 3.A.2.	Cytob1 ve RLB F2/RLB R2 primer çiftleri kullanılarak çoğaltılan cytochrome b ve 18S ssu rRNA genlerinin belirlenmesinde kullanılan oligonükleotid proplar	213
Çizelge 3.A.3.	PZR’ da kullanılmak üzere tasarlanan primer çiftleri	216
Çizelge 3.A.4.	Farklı bölgelere ait <i>T. annulata</i> izolatları ile bazı <i>Theileria</i> ve <i>Babesia</i> türlerine ait DNA örnekleri kullanılarak <i>Sfi</i> , <i>Tar</i> , sitokrom b ve Mero I primer çiftlerinin özgüllüğünün belirlenmesi amacıyla yapılan PZR sonuçları	214



<b>Çizelge 3.A.5.</b>	PZR’da kullanılan primer çiftlerinin duyarlılıkları	<b>231</b>
<b>Çizelge 3.A.6.</b>	Cyto b1 primer çifti ve daha önceki çalışmalarda <i>T.annulata</i> enfeksiyonunun teşhisinde kullanılan gen bölgeleri ile elde edilen duyarlılık sonuçları	<b>235</b>
<b>Çizelge 3.B.1.</b>	<i>Theileria annulata</i> , <i>B. bovis</i> ile <i>A. marginale</i> türlerinin multipleks PZR yöntemi ile teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan primer çiftleri	<b>249</b>
<b>Çizelge 3.B.2.</b>	Multipleks PCR’da kullanılan primer çiftleri ve bunların oligo analiz programı (1.0.2) kullanılarak elde edilen sonuçları	<b>269</b>
<b>Çizelge 3.B.3.</b>	Cytob1, bovar2A ve MAR1bB2 primer çiftlerinin tekli PZR ve multipleks PZR yöntemleri ile belirlenen duyarlılıklarının karşılaştırılması	<b>273</b>
<b>Çizelge 3.B.4.</b>	Saha şartlarında toplanan DNA örneklerinden elde edilen tekli ve multipleks PCR sonuçları	<b>277</b>
<b>Çizelge 3.C.1.</b>	Bazı izothermal çoğaltma yöntemleri ile PZR’ nin özellikleri	<b>291</b>
<b>Çizelge 3.C.2.</b>	LAMP metodu ile <i>T.annulata</i> DNA’sını çoğaltmakta kullanılan primer çiftleri ve bunların tasarlandığı gen bölgeleri	<b>302</b>
<b>Çizelge 3.C.3.</b>	LAMP metodu ile <i>B.bovis</i> türlerine ait DNA’ları çoğaltmakta kullanılan primer çiftleri ve bunların tasarlandığı gen bölgeleri	<b>304</b>
<b>Çizelge 3.C.4.</b>	PCR ve LAMP metodunun özgüllük ve duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması	<b>312</b>
<b>Çizelge 3.C.5.</b>	Sahadan toplanan DNA örneklerinin tekli ve multipleks PCR ile LAMP yöntemi kullanarak elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması	<b>320</b>

## ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1.1.	Sığırlarda hastalık oluşturan önemli <i>Theileria</i> türlerinden <i>T. annulata</i> , <i>T. parva</i> ve <i>T. sergenti</i> 'nin dünya üzerindeki dağılımı	6
Şekil 1.2.	<i>Theileria annulata</i> 'nın Yaşam Döngüsü	11
Şekil 1.3.	Tropikal theileriosis'e karşı sığırlarda gelişen doğal ve edinsel yanıt	19
Şekil 1.4.	Türkiye'de bulunan farklı coğrafik bölgeler, bunların içerisinde yer alan bölümler ile Ege bölgesinin biyoklimatik alanları	25
Şekil 1.5.	Aydın yöresinde <i>Hyalomma detritum</i> 'un yaşam döngüsü	30
Şekil 2.A.1.	Bakteriofaj lambda integras (Int) ve <i>E.coli</i> integrasyon konak faktör proteini (IHF) ihtiva eden BPclonase™ enzim karışımı tarafından katalize edilen lizojenik yol ile bakteriofaj lambda integras (Int), eksiyoaz (Xis) ve <i>E.coli</i> integrasyon konak faktör proteini (IHF) ihtiva eden LR clonase™ enzim karışımı tarafından katalize edilen litik yolla oluşan Gateway rekombinasyon reaksiyonunun şematik görünümü	67
Şekil 2.A.2.	<i>Theileria annulata</i> genomunda kodlanan proteinlerden Signal peptid, GPI anchor ve/veya transmembran alan ihtiva eden peptidlerin grafiksel dağılımı	79
Şekil 2.B.1.	TaSP proteinini kodlayan TA17315 geninin <i>T. annulata</i> Ankara izolatının genomik DNA'sına ait dördüncü kromozomu üzerindeki yerleşim yeri	107
Şekil 2.B.2.	TaSP molekülünü kodlayan gen bölgesinin haritası.	108
Şekil 2.B.3.	TaSP molekülünün protein haritası	109
Şekil 2.B.4.	TaSP molekülünün membran topolojisinin şematik görünümü	110
Şekil 2.B.5.	TaSP molekülünün hücrel yerleşiminin belirlenmesinde kullanılan rekombinant protein dizilimi ve bunun tüm protein üzerindeki yerleşim yeri.	112
Şekil 2.B.6.	Ta9 ve paralog genlerinin <i>T. annulata</i> gDNA'sı ikinci kromozomu üzerindeki yerleşim yerleri ve kodlanan proteinlerin ortak özellikleri	136
Şekil 2.B.7.	Ta9 paralog gen ailesince kodlanan proteinlerin amino asit düzeyinde clustal X (2.0) programı kullanılarak birbirleri ile karşılaştırılması.	138
Şekil 2.B.8.	Klonlanarak, pürifiye edilen Ta9 ve paralog genleri tarafından kodlanan proteinlerin dizilim analiz sonuçları.	140

<b>Şekil 2.B.9.</b>	<i>Theileria annulata</i> 'nın farklı allelleri tarafından kodlanan Ta9 (A) ve TA15710 (B) proteinlerinin amino asit düzeyinde karşılaştırılması	<b>150</b>
<b>Şekil 2.B.10.</b>	<i>Theileria annulata</i> 'nın farklı allelleri tarafından kodlanan TA15710 proteininin amino asit düzeyinde clustalX (2.0) programı kullanılarak karşılaştırılması	<b>151</b>
<b>Şekil 2.C.1.</b>	Farklı rekombinant proteinlerle yapılan ELISA'nın standardizasyonunda kullanılan antijen ve kontrol serum titrasyonları	<b>171</b>
<b>Şekil 2.C.2.</b>	Sporozoit yada yüksek pasajlı hücre kültürü ile deneysel enfekte hayvanlar ait serum örneklerinde optimize edilmiş antijen ve serum dilüsyonlarında TA06510, TaSP, Ta9 ve Ta9.4 ELISA'larıyla belirlenen IgG seviyelerine ait OD değerleri.	<b>179</b>
<b>Şekil 2.C.3.</b>	TaSP (A), Ta9 (B) ve Ta9.4 (C) ELISA'nın <i>T. annulata</i> ile enfekte ve enfekte olmayan sığır serumlarına ait yüzde pozitif (PP) verilerinin sıklık dağılımları	<b>184</b>
<b>Şekil 2.C.4.</b>	ELISA'da kullanılan rekombinant proteinlere (TaSP, Ta9 ve Ta9.4) ait TG-ROC analiz sonuçları	<b>186</b>
<b>Şekil 3.A.1.</b>	<i>Theileria annulata</i> Sfi gen ailesindeki korunmuş bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan primer çiftlerinin (Sfiset 1F/R, Sfiset 2F/R, Sfiset 3F/R, Sfiset 4F/R) yerleşim yerleri şematik olarak gösterimi	<b>219</b>
<b>Şekil 3.A.2.</b>	<i>Theileria annulata</i> Tar gen ailesindeki korunmuş bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan primer çiftlerinin (Tar A1F/R, Tar B1F/R, Tar C1F/R, Tar D1F/R, Tar E1F/R) yerleşim yerleri şematik olarak gösterimi	<b>219</b>
<b>Şekil 3.A.3.</b>	<i>Theileria annulata</i> MeroI geni üzerinde Mero1F ve Mero1R primer bölgelerinin şematik gösterimi	<b>225</b>
<b>Şekil 3.A.4.</b>	<i>Theileria annulata</i> mitokondriyal cytochrome b geni üzerinde Cytob1F/R ve Cytob2F/2R primer bölgelerinin şematik olarak gösterimi	<b>227</b>
<b>Şekil 3.A.5.</b>	<i>Theileria annulata</i> (XM949625.1), <i>B. bovis</i> (EU075182.1), <i>B. bigemina</i> (AF109354.1) ve <i>T. parva</i> (Z23263.1) türlerine ait mitokondriyal cytochrome b gen dizilimlerinin clustal X (1.83) programı kullanılarak birbirleri ile karşılaştırılması.	<b>225</b>
<b>Şekil 3.A.6.</b>	<i>Theileria annulata</i> 'nın farklı izolatlarının (W104; Dalama, W108; Aydın, W103; A.ova, W110; Diyarbakır, W89; Tunus, W105; Pendik and D7; Ankara/D7) sekans analizi sonuçlarının clustal X (1.83) programı ile karşılaştırılması	<b>230</b>
<b>Şekil 3.A.7</b>	Üç farklı çoklu kopyalı gen ailesine ait paralog nükleotid dizilimlerin karşılaştırılması	<b>236</b>

<b>Şekil 3.B.1</b>	<i>T. annulata</i> , <i>A. marginale</i> ve <i>B. bovis</i> türlerini çoğaltmada kullanılan primer çiftleri	<b>255</b>
<b>Şekil 3.B.2</b>	<i>Babesia bovis</i> 'in teşhisinde çoklu kopyaya sahip gen ailelerinin çoğaltılması amacıyla tasarlanan primer çiftleri ve bunların çoğaltacakları ailedeki genler arasında korunmuş olan bölgeler ve nükleotid dizilimleri	<b>256</b>
<b>Şekil 3.B.3</b>	<i>Babesia bovis</i> 'in çoğaltılmasında kullanılan bovar2A primer çiftinin tasarlandığı 24 vesalα alt ünite gen ailesinde görülen nükleotid polimorfizmi	<b>258</b>
<b>Şekil 3.B.4</b>	<i>Anaplasma marginale</i> 'nin teşhisinde kullanılmak üzere çoklu kopyaya sahip gen ailelerinin çoğaltılması amacıyla tasarlanan primer çiftleri ve bunların çoğaltacakları ailedeki genler arasında korunmuş olan bölgeler ve nükleotid dizilimleri	<b>260</b>
<b>Şekil 3.B.5</b>	<i>Theileria annulata</i> Ankara/D7 (A), <i>A. marginale</i> St.Maries (B) ve <i>B. bovis</i> Meksiko (C) türlerine ait gen bölgelerinin sırasıyla cytob1 (312 bp), MAR1bB2 (265 bp) ve bovar2A (166 bp) primer çiftleri kullanılarak multipleks PZR yöntemiyle çoğaltılan gen bölgelerinin dizilim sonuçlarının clustal X (1.83) programı kullanılarak NCBI data bankasındaki ilgili gen bölgeleri ile karşılaştırılması	<b>279</b>
<b>Şekil 3.C.1.</b>	LAMP metodu kullanılan primer çiftleri	<b>295</b>
<b>Şekil 3.C.2.</b>	LAMP metodu ile hedef DNA' nın çoğaltılması	<b>298</b>
<b>Şekil 3.C.3.</b>	<i>Theileria annulata</i> 'nın LAMP yöntemi ile teşhisinde tasarlanan primer çiftleri ve elde edilen sonuçlar	<b>308</b>
<b>Şekil 3.C.4.</b>	<i>Theileria annulata</i> 'nın LAMP yönteminde kullanılan F3/B3 primer çiftleri ile yapılan PZR sonucunda elde edilen ürünleri dizilim analiz sonuçları	<b>316</b>

## RESİMLER

	Sayfa
<b>Resim 2.A.1.</b> TaA2, D7 (A) ile <i>T. annulata</i> 'nın farklı izolatlarına (B 1 ve 2) ait hücre kültürlerinden hazırlanan protein ekstraktları ile 48 RES 42.inci gün serum örneği kullanılarak yapılan western blotlama sonucunda belirlenen immunodominant bantlar.	83
<b>Resim 2.A.2.</b> Tams-1/2, MeroI, TashHN, RP2/RP4, TaSP, TA06510, TA13755 (I.kısım) ve TA06470 rekombinant proteinleri ile elde edilen western blotlama sonuçları.	88
<b>Resim 2.A.3.</b> Makroşizontlar ile enfekte hücrelerde western blotlamalarda görülen immunodominant proteinlerin alt hücresele fraksiyonlarındaki dağılımı.	94
<b>Resim 2.B.1.</b> <i>Theileria annulata</i> Ankara sporozoit (21A, 23B, 48C ve 897A) ve <i>Theileria annulata</i> Ankara/Pendik yüksek pasajlı hücre kültürleri (pasaj 367) (54C, 891A, 32A ve 26A) enfekte hayvanlardan elde edilen RES 42. gün serum örnekleri ayrı ayrı kullanılarak yapılan Western blotlarda TaA2, D7 ekstraktlarında belirlenen bantların karşılaştırılması ve TaSP rekombinat proteinine karşı hayvanlarda görülen yanıtın incelenme sonuçları	121
<b>Resim 2.B.2.</b> <i>Theileria annulata</i> 'nın farklı izolatları, <i>T. parva</i> ve <i>T. lestoquardi</i> hücre kültürlerinden hazırlanan protein ekstraktları ile TaSP rekombinant proteininin 48C numaralı hayvana ait RES 42.inci gün bağışık serumu (B1, B2, B3, B4, B5, B6 ve B7) ve TaSP rekombinant proteinine karşı geliştirilen antiserum (A1, A2, A3, A4, A5, A6 ve A7) kullanılarak yapılan western blot sonuçları	125
<b>Resim 2.B.3.</b> Protein ekstraktlarında gözlenen immunodominant bantların TaSP olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılan western blot sonucu	129
<b>Resim 2.B.4.</b> Dynabead magnetik boncukları ile yapılan immunopresipitasyonda farklı elüsyonlar sonrası elde edilen proteinlerle RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan western blotlama sonuçları.	131
<b>Resim 2.B.5.</b> TA15705 (Ta9) rekombinant proteini ile yapılan bloklama deneyinin Western blot sonucu.	143
<b>Resim 2.B.6.</b> TA15710 rekombinant proteini ile yapılan bloklama deneyinin Western blot sonucu.	144
<b>Resim 2.B.7.</b> TA15710 (Ta9.4) ve TA15705 (Ta9) rekombinant proteinleri ile yapılan bloklama deneyinin Western blot sonuçları	147
<b>Resim 2.B.8.</b> Enfekte D7, TBL ile enfekte olmayan BL20 hücre ekstraktlarına karşı bloklanmamış 48C RES 42.inci gün serumu (A), Ta9 (B) ve Ta9.4 (C) rekombinant proteinleri ile bloklanmış 48C RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan western blot sonuçları	148

<b>Resim 2.B.9.</b>	TA15685, TA15690 ve TA15695 rekombinant proteinlerine ait western blot sonuçları	<b>149</b>
<b>Resim 3.A.1.</b>	<i>Sfi</i> genine ait korunmuş bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan <i>Sfiset1</i> <i>Sfiset2</i> primer çiftlerinin tasarlandığı bölgeler	<b>220</b>
<b>Resim 3.A.2.</b>	<i>Sfi</i> genine ait korunmuş bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan <i>Sfiset3</i> ve <i>Sfiset4</i> primer çiftlerinin tasarlandığı bölgeler	<b>221</b>
<b>Resim 3.A.3.</b>	<i>Sfi</i> set1 ve set2, <i>Tar</i> A1, B1, C1, D1 ve E1, Cyto b1 ve b2, MeroI primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR sonuçları	<b>222</b>
<b>Resim 3.A.4.</b>	<i>Theileria annulata</i> Ankara izolatu ile enfekte edilen sığır kanının on katlı olarak enfekte olmayan sığır kanında sulandırılması ile elde edilen DNA örnekleri kullanılarak Cytob1 PZR'unun duyarlılığının belirlenmesi	<b>232</b>
<b>Resim 3.A.5.</b>	Sitokrom b ve 18S ssu rRNA geninin RLB sonuçları	<b>234</b>
<b>Resim 3.B.1.</b>	<i>Anaplasma marginale</i> 'nin teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan MAR1bA (A), MAR1bB1 (B), MAR1bB2 (C), MARorfX (D) ve MARorfY (E) primer çiftlerinin tekli PZR ile özgüllüklerinin belirlenmesi	<b>264</b>
<b>Resim 3.B.2.</b>	<i>B. bovis</i> 'in teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan bovar1 (A), bovar40S (B), bovar2A (C), bovar2B (D), bovarABC (E), bovar3A (F) ve bovar3B (G) primer çiftlerinin tekli PZR ile özgüllüklerinin belirlenmesi	<b>267</b>
<b>Resim 3.B.3.</b>	<i>Theileria</i> , <i>Babesia</i> ve <i>Anaplasma</i> türlerinin Cytob1 (A), MAR1bB2 (B) ve bovar2A(C) primer çiftleri ile ayrı olarak çoğaltılarak özgüllüklerinin belirlenmesi	<b>271</b>
<b>Resim 3.B.4.</b>	<i>Theileria annulata</i> Ankara/D7 (A), <i>A. marginale</i> St. Maries (B) ve <i>B. bovis</i> aşı suşu T (C) DNA'larının her birinin 10 katlı sulandırılarak elde edilen sulandırmalar kullanılarak yapılan multipleks PCR sonuçları	<b>274</b>
<b>Resim 3.B.5.</b>	<i>Theileria annulata</i> Ankara/D7, <i>B. bovis</i> T aşı suşu Israel ve <i>A. marginale</i> St. Maries DNA karışımı kullanılarak yapılan multipleks PCR' in sensitivitesinin belirlenmesinde ethidyum bromid ile boyanmış agaroz jel (%2,5) elektroforez görüntüsü	<b>275</b>
<b>Resim 3.B.6.</b>	Sahadan toplanan bazı DNA örnekleri kullanılarak yapılan multipleks PCR sonuçlarının ethidyum bromid ile boyanmış agaroz jel (%2,5) görüntüsü	<b>275</b>
<b>Resim 3.C.1.</b>	LAMP metodu ile çoğaltılan pozitif ve negatif DNA örneklerinin bulanıklık (türbitide), floresan ve agaroz gel elektroforezi yöntemleri ile belirlenmesi	<b>292</b>

- Resim 3.C.2.** (A); *T. annulata*'nın farklı izolatları ve diğer bazı *Theileira*, *Babesia* ve *Anaplasma* türlerine ait DNA'ları ile CYTOB1 primer çiftleri kullanarak yapılan LAMP reaksiyonu. (B ve C); *T. annulata*'ya ait cytochrome b genini çoğaltmakta kullanılan CYTOB1 primer çiftleri yapılan LAMP reaksiyonunun (B) ve cyto b1 primer çifti kullanılarak yapılan PZR (C)'in duyarlılıklarının *T. annulata*'ya ait DNA örneklerinin 10 katlı sulandırılmaları kullanılarak belirlenmesi **310**
- Resim 3.C.3.** *Theileria annulata*'ya ait C9 piroplasm (A) ve D7 makroşizont kültürlerden (B) hazırlanan DNA'ların 10 katlı dilüsyonlarında ( $10^{-1}$ - $10^{-10}$ ) cytochrome b genini LAMP yöntemi ile çoğaltmakta kullanılan CYTOB1 primer çiftleri (1) ve PZR yöntemi ile çoğaltmada kullanılan F3/B3 primer çiftleri (3) ile elde edilen duyarlılıklarının karşılaştırılması. (2); LAMP yöntemi ile çoğaltılan ürünlerin syber green (Invitrogen™) ile görüntülenmesi **313**
- Resim 3.C.4.** LAMP ürünlerinin Eco RI restriksiyon enzimleri ile kesiliktten sonra yapılan % 2 agaroz jel elektroforez görüntüsü **318**
- Resim 3.C.5.** *Babesia bovis* türüne ait rhostry protein 1 geninin Hiroshi ve ark (2007) tarafından belirlenen primerler kullanılarak LAMP reaksiyonu ile çoğaltılması **319**
- Resim 3.C.6.** *Theileria annulata* enfeksiyonunun endemik olarak görüldüğü bölgeden toplanan DNA örneklerinin CYTOB1 primer çiftleri kullanılarak LAMP reaksiyonu ile çoğaltılması **321**

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

### 1.1 Genel Bilgi

#### 1.1.1. Önemli *Theileria* Türleri

*Theileria* soyunda keneler tarafından nakledilen, evcil hayvanlar ve bazı memelilerde hastalık oluşturan türler bulunur (Çizelge 1.1). Sığırlarda hastalık oluşturan beş *Theileria* türü bulunmakta ve bu türler arasında en fazla ekonomik öneme sahip olanları *T. annulata* ve *T. parva*'dır. Bu türler ilk kez yaban sığırlarında (buffalo ya da bizon) görüldüğü öngörülen ortak bir atadan (*Theileria* spp.) geldiği düşünülmektedir, ancak ortak ata olarak düşünülen bu türün farklılaşarak diğer türleri oluşturmasının sığırlara adaptasyon öncesinde mi yoksa sonrasında mı olduğu hakkında kesin bir bilgi bulunmamaktadır (Uilenberg 1981). Her iki durumda da, hastalık yaban sığırlarında genellikle fazla patojen olmayıp, özellikle kültür ırkı sığırlar için patojen özellik göstermektedir.

*Theileria* soyunda bulunan türlerin sistematikteki yeri halen tam anlamıyla çözülebilmemiş değildir. Son yıllarda genetik düzeyde yaşanan gelişmeler ile Apikomplexa kökünde bulunan çoğu türün genom dizilimlerinin belirlenmesi ve / veya hali hazırda belirlenmiyor olması bunların sistematikteki yeri hakkında yeni bilgiler sunmaktadır. Bununla birlikte, türlerin genetik düzeyde yapılan sınıflandırmaları kendi aralarında farklılıklar göstermektedir. Bu sebeple, *T. annulata*'nın sistematikteki yeri Levine (1988)'na göre aşağıda verilmiştir:

Alem: Animale

Alem altı: Protozoa

Anaç: Apikomplexa

Sınıf: Sporozoea

Sınıf altı: Piroplasmia

Dizi: Piroplasmida

Aile: Theileriidae

Soy: *Theileria*

Tür: *T. annulata* (Dschunkowsky ve Luhs, 1904)

*T. parva* (Theiler, 1904) ve diğer türler



**Çizelge 1.1.** Evcil ruminatlarda hastalık oluşturan *Theileria* türleri.

<b>Tür</b>	<b>Omurgalı ara konak</b>	<b>Oluşturduğu hastalık</b>	<b>Omurgasız ara Konak (vektör)</b>	<b>Dünya üzerindeki dağılımı</b>
<i>Theileria annulata</i>	Sığır ve yak ( <i>Bos grunniens</i> )	Tropikal theileriosis	<i>Hyalomma</i> spp.	Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Ortadoğu, Orta Asya, Hindistan ve Kuzey Çin
<i>Theileria parva</i>	Sığır	Batı Sahil Humması, Koridor Hastalığı veya Zimbabve theileriosisi	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> ve diğer <i>Rhipicephalus</i> spp.	Batı ve Güney Afrika
<i>Theileria taurotragi</i>	Sığır (ilk kez Afrika geyiklerinde bulunmuştur)	<i>T. taurotragi</i> enfeksiyonu	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Batı ve Güney Afrika
<i>Theileria parva</i> ve / veya <i>Theileria taurotragi</i>	Sığır	Dönme Hastalığı	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Batı ve Güney Afrika
<i>Theileria mutans</i>	Sığır	<i>T. mutans</i> enfeksiyonu	<i>Amblyomma</i> spp.	Batı Afrika
<i>Theileria lestoquardi</i>	Koyun ve keçi	Malignant ovine / caprine theileriosis	<i>Hyalomma</i> spp.	Akdeniz bölgesi, Sudan, Batı ve Orta Asya ile Hindistan
<i>Theileria sergenti</i>	Sığır ve asya bizonu ( <i>Bubalus bubalis</i> )	<i>T. sergenti</i> Enfeksiyonu	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Batı Asya ve Japonya

- **Theileria annulata**

*Theileria annulata* (Dschunkowsky 1904) ilk kez 1904 yılında Trankaukasyan sığırlarında bulunmuş ve '*Piroplasma annulatum*' olarak isimlendirilmiştir. Parazitin omurgalı konaktaki şizont döneminin tespitiyle birlikte *Theileria annulata* olarak isimlendirilmiştir (Bettencourt 1907). *T. annulata*, 'Tropikal theileriosis', 'Mısır Humması', 'Akdeniz sahil humması' veya 'Tropikal piroplasmosis' gibi çeşitli isimler ile bilinen hastalığın etkenidir. Sığır, manda, zebu ve bizonlarda görülen etken kan hücrelerinde yaşar (Mimoğlu ve ark 1969).

Tropical theileriosis, Kuzey Afrika'da batıda Fas'tan başlayarak doğuda Mısır'a kadar olan bölgede görülür. Bu alan Afrika Sahra bölgesinin alt kesimlerindeki Sudan'a kadar uzanır. Sudan'ın bu kısımlarında *T. annulata* ve *T. parva* enfeksiyonu birlikte görülmektedir. Bununla birlikte İspanya, Portekiz, İtalya ve Yunanistan'ın güney bölgeleri hastalığın endemik olduğu alanlardır. Hastalık Türkiye'ninde içerisinde bulunduğu Ortadoğu ve Orta Asya kuşağı ile Hindistan'ı da içine alacak şekilde Uzakdoğu da Güney Rusya ve Kuzey Çin'e kadar uzanan yaygın bir bölgede gözlenmektedir (Şekil 1.1). Hastalığın bu denli yaygın olarak görülmesinin nedeni bu bölgelerdeki çevre koşullarının hastalığa vektörlük yapan *Hyalomma* soyuna bağlı ixodid keneler için uygun şartlar ihtiva etmesinden kaynaklanır (Purnell 1978). *Theileria annulata*, iki ya da üç konakçılı özellik gösteren keneler tarafından trans-stadial olarak nakledilirler. Hastalığın nakledilmesinde rol alan 15 adet *Hyalomma* soyuna bağlı tür olduğu belirlenmiştir (Robinson 1982). Doğada *Theileria annulata*'nın bulaşmasında sığır-vektör kene-sığır temelli bir döngü olmasına karşın hastalığı taşıyan enfekte erkek kenelerin rastlantısal olarak kan emdiği hayvanı bırakarak başka bir hayvandan kan emerek de hastalığı bulaştırabileceği bazı kaynaklarda bildirilmiştir (Pipano 2006).

*Theileria annulata* kaynaklı enfeksiyonların yaygınlığı ve görülme sıklığı hastalığı nakleden *Hyalomma* soyuna bağlı kenelerin biyolojisi ve coğrafi dağılımı ile sınırlıdır. Endemik bölgelerde vakaların çoğu Haziran-Eylül ayları arasında (Pipano 1976, Sergeant 1945) görülmesine karşın hastalığa sporodik olarak yıl boyunca rastlamak mümkündür (Flach ve Ouhelli 1992).

Tropikal theileriosis kaynaklı olarak oluşan ekonomik kayıpların önemli kısmını mortalite, verim azalması, hastalığın kontrolü için uygulanan aşılama, bulaşmanın önlenmesi için yapılan kene mücadelesi ile teşhis ve tedavi masrafları oluşturmaktadır (Gharbi ve ark 2006, Tisdell 1999, Wilkie ve ark 1998).

- **Theileria parva**

Batı Sahili Humması (ECF; East Cost Fever) adı verilen hastalığa yol açan *T. parva*, asıl olarak kahverengi kulak kenisi olarak bilinen, *Rhiphicephalus appendiculatus* tarafından nakledilmektedir. ECF Batı Afrika'da endemik olarak görülmektedir (Şekil 1.1). Hastalığın yaygınlaşmasında bölgeye kolonize olan Avrupalıların beraberlerinde getirdiği duyarlı sığırların önemli rolü olmuştur (Norval ve ark 1992). Kontrol altına alınmadığı takdirde, bu duyarlı hayvanlarda %90'lara varan ölümler görülebilmektedir (Lawrence ve ark 2006).

Aynı zamanda Afrika Sahrasında görülen Koridor Hastalığı, Zimbabwe theileriosis ve Dönme Hastalığı gibi hastalıkların oluşmasında da rol almaktadır. Koridor Hastalığı, bizonlarda bulunan *T. parva* türlerinin keneler tarafından nakledilmesiyle oluşan ve klinik olarak ECF'ye benzerlik gösteren bir hastalıktır (Lawrence ve Williamson 2006b). Ancak, parazit sığırlara iyi adapte olamamıştır ve sığırlarda etkenin piroplasm formuna rastlanmaz, bu da hastalığın yaşam döngüsünde sığırlar arasında kene yoluyla naklin oluşmasını engeller. Dönme Hastalığı ise, *T. parva* kökenli enfeksiyonların anormal bir formundan kaynaklanan, enfekte lenfosit hücrelerinin beyin damarlarında çökeltiler oluşturması sonucu şekillenen ateşsiz, sinirsel bir hastalıktır (Lawrence ve ark 2006).

- **Theileria sergenti**

Sığırlarda önemli bir hastalığa neden olan bir diğer *Theileria* türü de *T. sergenti*'dir. İlk kez Yamikoff ve Dekhtereff tarafından 1930 yılında Batı Sibirya'nın Vladivostok bölgesinde '*Gonderia sergenti*' adıyla tanımlanmıştır. *T. sergenti* Japonya, Batı Rusya ve Batı Çin bölgesindeki (Şekil 1.1) sığırlarda ölümcül enfeksiyonlara yol açmaktadır.

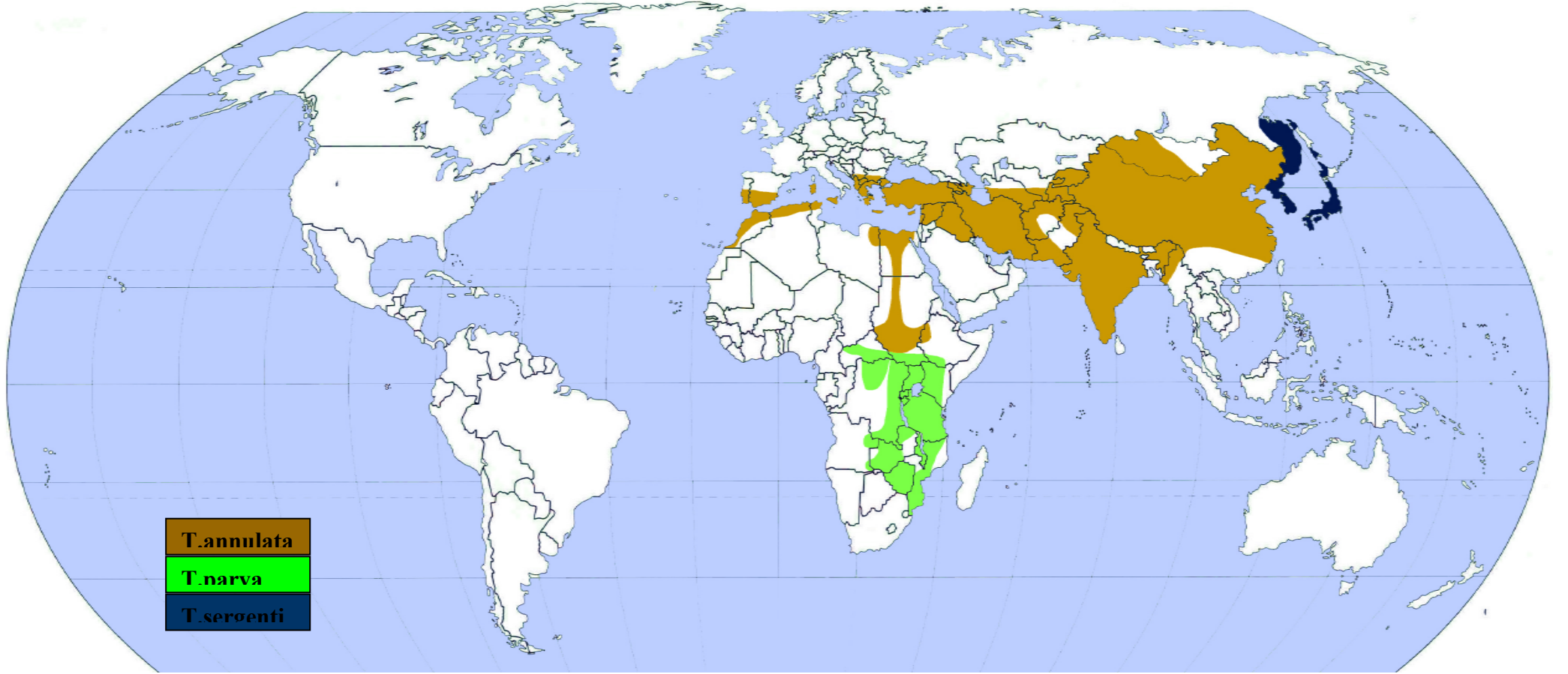
*Theileria buffeli/orientalis* grubu olarak adlandırılan parazitlerin filogenetik yerlerinin belirlenmesi amacıyla, ssRNA (small subunit RNA) gen dizilimlerine bakılarak yapılan çalışma sonucunda *Theileria* türleri iki gruba ayrılmıştır (Chansiri ve ark 1999). Patojenik *T. annulata*, *T. parva* ve *T. taurotragi* türlerinin kendi içinde bir grup oluştururken, *T. sergenti* ise patojenik olmayan *T. buffeli* türlerinin içinde bulunduğu diğer grup içinde yer almıştır. Çoğunluğunu patojen olmayan türlerin oluşturduğu ve *T. sergenti*'nin de içinde bulunduğu bu grup konak hücrelerinin farklılaşarak çoğalmasını sağlayamayan benign türlerden oluşmaktadır. Ancak yalnızca ssRNA gen dizilimlerine bakılarak yapılan bu tür filogenetik çalışmalardan elde edilen sonuçlar bize sınıflandırılmada kesin bir bilgi vermemektedir.

- **Theileria lestoquardi**

*Theileria lestoquardi*, koyun ve keçilerde görülen ekonomik öneme sahip en patojen türdür (Lawrence 2006). *Hyalomma anatolicum anatolicum* kenelerinin naklettiği bu türün neden olduğu hastalık (Malign ovine theileriosis) Avrupa'nın güneybatısında, Rusya'nın güney kesimlerinde ve Ortadoğu'da görülmektedir. Bu parazit antijenik olarak *T. annulata*'ya benzerlik göstermesine rağmen sığırları enfekte etme özelliğine sahip değildir. Koyunlarda yapılan deneysel çalışmalarda, *T. lestoquardi* ile oluşturulan enfeksiyonun hayvanları daha sonra oluşturulan *T. annulata* enfeksiyonundan koruyabildiği, bununla birlikte *T. annulata* ile oluşturulan birincil enfeksiyonun *T. lestoquardi* ile oluşturulan ikincil enfeksiyondan önemli klinik belirtilerin görülmesini önlemek dışında herhangi bir korunma sağlayamadığı görülmüştür (Lawrence 1997, Leemans ve ark 1999a,b). Malign ovine theileriosis'de görülen patojenik etkiler sığırlarda görülen *Theileria* türlerinin oluşturduğu patojenik etkilere benzerlik göstermektedir.

- **Diğer Patojenik Theileria Türleri**

*Theileria mutans*, Afrika Sahrasının alt kesimleri ile Karayip Adalarında yaygın olarak görülen (Lawrence ve Williamson 2006a) bir tür olup *Theileria* etkenleri ile benzer bir yaşam döngüsüne sahip olmasına rağmen çoğalması şizont döneminde değil piroplasm döneminde olmaktadır. Batı Afrika'daki hayvanlarda yoğun piroplasm enfeksiyonuyla beraber gelişen damar içi hemoliz sonucu ileri düzeyde anemi, şiddetli klinik bulgulara sebep olur. *Theileria taurotragi*, *Rhiphicephalus* türü keneler tarafından nakledilmekte ve genelde *T. parva* ile beraber 'Dönme Hastalığına' neden olmaktadır (de Vos ve ark 1981).



Şekil 1.1. Sığırlarda hastalık oluşturan önemli *Theileria* türlerinden *T. annulata*, *T. parva* ve *T. sergenti*'nin dünya üzerindeki dağılımı.

## 1.2. *Theileria annulata*'nın Yaşam Çemberi

*Theileria annulata*, keneler tarafından nakledilen, zorunlu hücre içi parazittir. *T.annulata* hem vektör kenelerde hem de omurgalı konakta birbirinden morfolojik olarak farklılık gösteren gelişme dönemleri geçirir. Parazitin yaşam çemberi, omurgalı konakta şizogoni ve merogoni ile ara konak olan vektör kenelerde gametogoni ve sporogoni olmak üzere dört temel dönemden oluşur (Şekil 1.2).

### 1.2.1. Omurgalı Ara Konaktaki (Sığır) Dönem

Vektör kene, enfeksiyonu sığırlar üzerinde beslenirken nakleder. Bazen, konjenital yolla rastlantısal olarak buzağılara bulaşma olabilmektedir. Bu durum özellikle buzağı doğumlarından sonraki ilk bir hafta içinde görülen hastalık tablosunda göz önünde bulundurulmalıdır (Levine 1985). Hastalığın sığırlara bulaşmasında sporozoit adı verilen, 0,75–1,5 ( $\approx$ 1)  $\mu$ m boyunda, oval yapılı, tek çekirdekli, 20–25 nm kalınlıkta ve tripsine duyarlı belirgin bir dış tabakaya sahip parazit formları rol oynamaktadır. Çekirdek sporozoitin yarısını işgal ederken, çekirdeğin karşı kutbunda rhostilerin (2–3 adet) tutunduğu apikal kompleks bulunmaktadır. Sporozoitlerde bulunan tek mitokondrion ile apikoplast denen yapı birbirleri ile yakın ilişki içindedir ve bu organeller çekirdek zarı ile ilintili halde bulunur. Sporozoit stoplazmasının kalan kısmında serbest ribozomlar (granüllü ve granülsüz) ve birçok elektron dense mikrosferler yer almaktadır (Shaw ve ark 1991). Nimf ya da olgun dönemdeki enfekte kenelerin tükürük bezi asini hücrelerinde bulunan sporozitler, kenenin kan emmesi esnasında omurgalı konağa nakledilirler. Kenenin, omurgalı konak üzerinde beslenme süresi kene türleri ile birçok çevresel faktörün etkisi altındadır. Enfekte kenenin kan emme esnasında tükürük bezlerinde bulunan sporozoitler beslenmenin ilk döneminde değil, bunun aksine ilerleyen dönemlerinde ve az miktarlarda yavaşça (fasıllı olarak) ara konağa nakledilmektedir. Sporozoitlerin, konak hücrelerine giriş yerinin tam olarak neresi olduğu bilinmemekle birlikte, muhtemelen bu girişin enfekte kenenin kan emdiği tarafta ya da buraya en yakın lenf yumrusunda oluşabileceği varsayılmaktadır. Kenenin kan emdiği bölgenin etrafında oluşan lökosit hücrelerinden zengin yangısal reaksiyon sporozoitlerin muhtemelen bu aşamada hücre içine girebileceğini düşündürmekte, ancak sporozoitler kene tarafından nakledildikten sonraki birkaç dakika içerisinde çevredeki en yakın lenf yumrusuna da ulaşabildiği (Shaw ve ark 1991) düşünüldüğünde sporozoitlerin konak hücrelere giriş yerinin tam olarak belirlenebilmesi için detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. *T. annulata* ve *T.parva* türlerinin omurgalı konakta hangi lökosit popülasyonunu enfekte ettiğini belirlemek

için yapılan *in vitro* deneysel çalışmada; purifiye edilmiş sığır hücreleri (monosit, T-hücreleri) ve bunların MHC (büyük doku uyşum kompleksi) sınıf II pozitif ve negatif olan alt populasyonları her bir parazit türüne ait sporozoitler ile ayrı ayrı muamele edilmiş ve *T.annulata*'nın tercihen monosit / makrofaj kökenli MHC sınıf II pozitif hücreleri enfekte ettiği gözlenirken, T-hücrelerinde az oranda enfeksiyon oluşmuş, MHC sınıf II negatif hücrelerde ise enfeksiyon oranının neredeyse yok denecek kadar az olduğu belirtilmiştir. *T.parva*'nın ise, *T. annulata*'nın tam aksine tercihen T-hücrelerini enfekte ettiği, ancak monosit / makrofaj kökenli hücreleri enfekte edemediği görülmüştür (Glass ve ark 1989). Benzer bir çalışmada, *T. annulata*'nın *T. parva*'ya nazaran B-hücrelerini daha fazla enfekte ettiği gösterilmiştir (Spooner ve ark 1989).

Sporozoitler sığır vücuduna inokule olduktan sonraki 5–60 dakika içerisinde reseptör aracılı endositoz yoluyla lökositlere girerler. Her bir konak hücreesine en fazla 15 sporozoit girebilmektedir. Sporozoitlerin hücreye girişi; konak hücreye bağlanma, parazitin hücre membranı ile sarılması ve hücre içine alınma adı verilen, farklı ancak birbirinin devamı niteliğinde olan bir seri olaylar silsilesi şeklinde gelişir.

*Theileria* sporozoitlerinde apikompleksa anacındaki diğer türlerden farklı olarak mikronemler ve özelleşmiş sitoskeletal yapılar bulunmaz. Bu nedenle *Theileria* sporozoitleri hareketsizdir. İlk bağlanma pasif yolla, sıcaklığa bağımlı olmadan 0 – 4 °C arasındaki sıcaklıklarda dahi gerçekleşebilir. Sporozoitlerin konak hücreye bağlanmasında parazitin yönünün (oriyantasyonunun) herhangi bir önemi yoktur, yani parazit konak hücreye giriş için apikal ucu ile hücre membranını karşı karşıya getirmek için tekrar oriyante olmaya ihtiyaç duymaz. Bununla birlikte, bağlanmadan sonraki aşamalar aktif yolla ve sıcaklığa bağımlı olarak gerçekleşir (Jura 1984, Shaw ve ark 1991, 1997). Hücreye giriş, parazit ve hücre membranlarının karşı karşıya geldiği kısımdan başlayarak çevresel olarak parazitin hücre membranı ile sarılması ve hücre içine alınma ile sonuçlanır. Sporozoit ile konak hücre arasındaki ilk bağlanma oldukça kuvvetlidir ve sporozoitler bir defa bağlandıklarında hücre içine giriş 37°C'de yaklaşık üç dakikada içerisinde ve bundan sonraki hücre sitoplazması içinde serbest kalma ise 15 dakika içinde gerçekleşir. Etrafını saran hücre membranından kurtulup sitoplazma içinde serbest kalamayan parazitler yaşamlarını devam ettiremezler. Sporozoitlerin konak hücreye girişi canlı ve metabolik olarak aktif olmalarına ve ortamın pH'sına bağlıdır (Shaw ve ark 1991, 1997). *Theileria* türleri konak hücre sitoplazması içinde çoğalır ve farklılaşırlar, ancak apikompleksa anacında bulunan *Plasmodium* ve *Toxoplasma* gibi türlerden farklı olarak etraflarında herhangi bir parazitofor vakuol bulunmaz (Mehlhorn 1984). Hücre içine girişten sonra, parazit rhoptri ve microsiferlerinde bulunan proteinleri

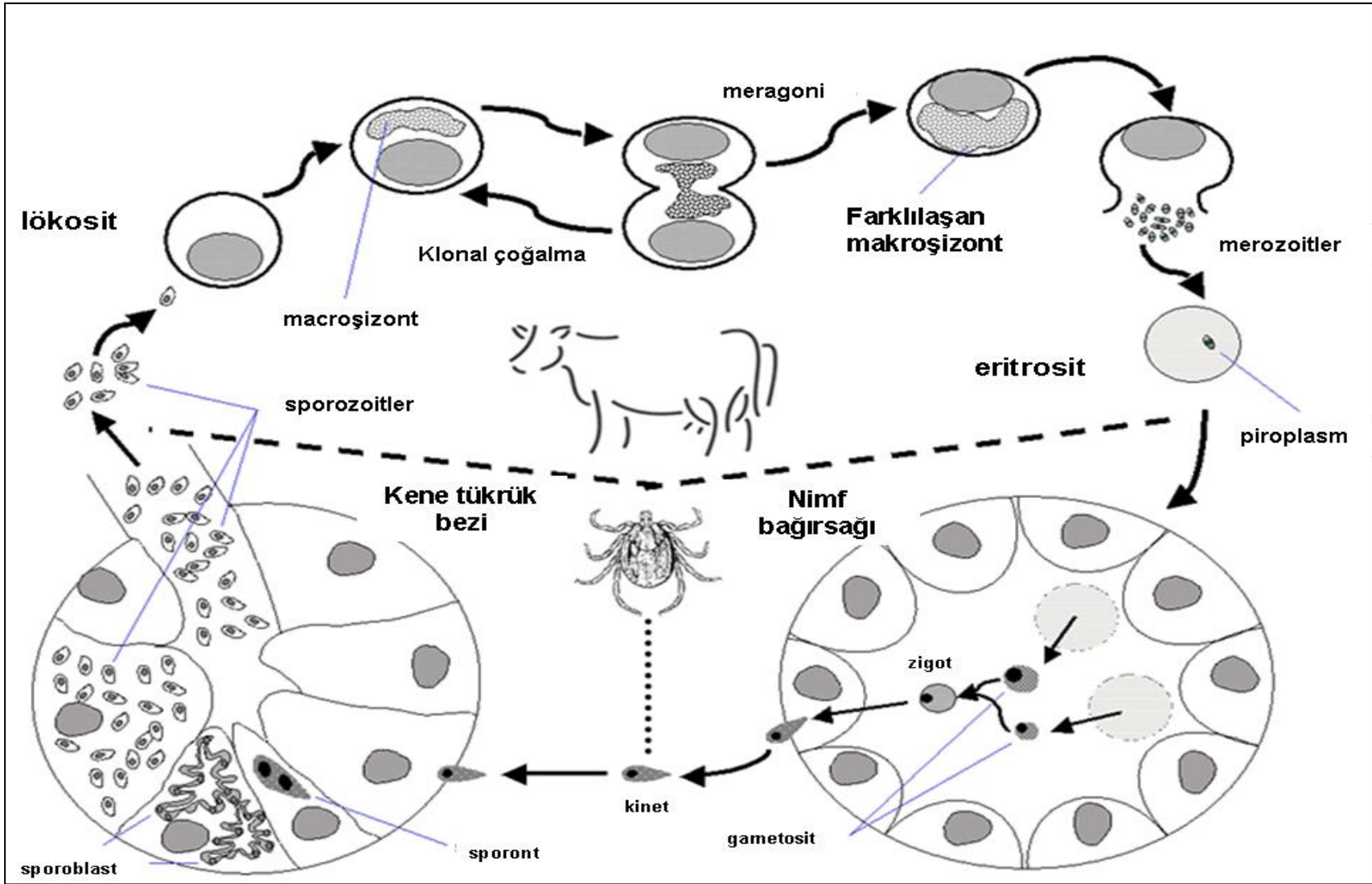
etrafını saran hücre membranından kurtulup sitoplazma içerisinde serbest kalmak için dışarı salgılar. Bununla eş zamanlı olarak konak hücre mikrotubulleri parazit tarafından salgılanan mikrosferlerle birleşerek, parazitin yüzeyini kuşatır. (Fawcett ve ark 1984, Fawcett ve ark 1982b, Shaw ve ark 1991, Shayan ve Ahmed 1997).

Sporozoitlerin konak hücre içine girişi hem konak hücrede hem de sporozoitlerde önemli değişimleri başlatır. Konak hücre sitoplasmasına yerleşen parazit hem çok çekirdekli şizontları oluşturmak için farklılaşmaya başlar hem de konak hücrede transformasyona (değişime) yol açarak enfekte hücrelerin klonal genişlemesine yol açar. *Theileria* ve apikompleksa anacındaki diğer parazitler, DNA replikasyonu ve mitoz bölünmeyi hücre bölünmesinden ayrı şekilde yapabilirler. Hücre içine girmiş olan parazit hücre bölünmesi yapmadan birçok kez DNA replikasyonu ve çekirdek bölünmesi yaşar. Bu bölünmelerin sonucunda konak hücre sitoplazması içinde çok çekirdekli sinsitiyal (içleri sitoplazma ile dolu olan hücre benzeri yapılar) cisimler oluşur. Aynı zamanda, yaşam siklusunun farklı dönemlerinde parazit konak hücre döngüsünde değişikliklere neden olur. Sporozoitler konak hücre içinde farklılaşarak trofozoitleri bunlarda yukarıda anlatıldığı şekilde gelişerek çok çekirdekli makroşizontları oluştururlar. Makroşizontlar hücre sitoplazması içerisinde serbest olarak yerleşmişlerdir ve dış yüzeyleri plasma membranı ile kaplı durumdadır (Shaw ve Tilney 1992). Makroşizontların çekirdekleri sitoplazma içerisinde dağınık halde bulunur ve her biri porlu nükleer zar ile çevrilidir. *In vitro* ortamda, makroşizontlar ortalama 12 çekirdekli ve her bir çekirdek yaklaşık 1,5 µm çapındadır. (Mehlhorn 1984). Parazit bu çok çekirdekli dönemde konak hücrelerinin bölünüp çoğalmasına sebep olur. Parazitte bu aşamada bölünerek çoğalmakta ve konak hücrenin mitotik çıkıntılarına bağlanıp eş zamanlı olarak konak hücre ile bölünüp oluşan yeni hücrelere dağılmaktadır. Çoğalma ilk olarak enfekte lenf yumrularında olur, ancak sonraki dönemlerde enfekte hücreler kontrolsüz olarak kanser hücrelerine benzer şekilde çoğalıp metastazik özellik göstererek kan ile diğer doku ve organlara yayılır. Parazit ile enfekte hücreler, enfeksiyonun başlamasından sonraki beşinci günde kenenin sporozoiti inokule ettiği taraftaki yüzeysel lenf yumrularından alınan biopsi örneklerinden hazırlanan preparatlarda tespit edilebilmektedir. Yaşam çemberini tamamlayabilmek için oluşmuş olan makroşizontların bir bölümü farklılaşarak çok sayıda tek çekirdekli merozoitleri oluştururlar (Shaw 2003). Bu dönemde şizontlar büyüyüp genişler ve bunu çok ayda tek çekirdekli merozoitlerin oluşması takip eder, oluşan bu merozoitler konak hücre sitoplazmasında serbest halde bulunurlar.

Daha sonra olgunlaşan merozoitler konak hücre plazma membranının yırtılmasından sonra serbest halde kana geçerler. Olgun merozoitler yapısal olarak sporozoitlere çok



benzerler. Her bir merozoit apikal kutbunda rhoptrileri ihtiva ederken, sporozoitlerde görülen mikrosferler ve diğer bazı organeller (mikronem veya yoğun granüller gibi) bulunmaz. Sporozoitlere benzer şekilde, merozoitlerin yönünün konak eritrositlerine girişte önemi yoktur. Eritrosit içine giriş merozoit ve hücre membranının karşı karşıya geldiği kısımdan başlayarak çevresel olarak parazitin hücre membranı ile sarılması ve hücre içine alınma ile sonuçlanır. Hücre içine alınan merozoitin etrafı tamamıyla hücre membranı ile sarılı durumdadır. Daha sonra rhoptrilerde bulunan proteinler salgılanarak parazit etrafını saran hücre membranında kurtularak sitoplazma içerisinde serbest hale geçer. Ancak konak hücreye giren sporozoitlerden farklı olarak konak hücre mikrotubulleri ile her hangi bir birleşme olmaz. Merozoitler eritrositlere girdikten sonra piroplasm olarak adlandırılan formları oluştururlar. Parazitin bu formları makroşizontların ilk görülmesinden sonraki bir ila üç gün içinde kanda belirlenebilirler (ya da enfeksiyondan sonraki 8–10 gün içinde) ve enfekte hayvanlar parazitin bu formunu yıllar boyunca taşıyabilirler (Pipano 2006). Piroplasmalar tek bir hücre membranı ile çevrili, küre, oval ya da virgül şeklindeki yapılardır (Mehlhorn 1984). Merozoitlerin hücre içine girişinde rol oynayan faktörlerin neler olduğu tam olarak bilinmemektedir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda, metalloprotease inhibitörlerinin *T. sergenti* merozoitlerinin eritrositlere girişinin bloke ettiği gösterilmiş ve bu da eritrosite girişte enzimatik yolların kullanılıyor olabileceğini düşündürmektedir. Buna ek olarak, yüzeyinde bulunan sülfat glikokonjugatlarının varlığına bağlı olarak merozoitlerin hücreye bağlanması ve girişi heparin kullanılarak bloke edilmiştir (Hagiwara ve ark 1996, Hagiwara ve ark 1997). Eritrositler içindeki yaşam çemberi türler arasında farklılık gösterir. Piroplasmaların hücre kültüründe merogoni benzeri (karyokinezi takip eden bir sitokinez yoluyla) yolla bölündükleri gösterilmiştir. Çoğalan bu piroplasmalar, merozoitlerin lökositleri terk etmesine benzer yolla eritrositleri terk ederek yeni eritrositleri enfekte edebilecekleri kanısı vardır (Conrad ve ark 1985). Ancak, *T. annulata* ve *T. parva*'da eritrosit içindeki bu çoğalma sınırlı düzeydedir. Bu türlerde genelde enfekte lökositlerce üretilen merozoitler devamlı olarak yeni eritrositleri invaze ederler (Ilhan 1999). Keneler, enfekte hayvan üzerinde beslenmeleri esnasında piroplasmalarla enfekte olmuş eritrositleri alarak parazitin ara konaktaki yaşam çemberinin devamını sağlarlar.



Şekil 1.2. *Theileria annulata*'nın Yaşam Döngüsü (*Devam*)

**Şekil 1.2.** *Theileria annulata*'nın Yaşam Döngüsü; enfekte kenenin kan emmesi esnasında omurgalı ara konak olan sığıra inokule edilen sporozoitler myeloid hücrelere girerek burada çok çekirdekli makroşizontlara farklılaşırlar. Enfekte hücrelerdeki klonal çoğalma esnasında bir kısım makroşizontlar farklılaşarak merozoitleri oluştururlar. Oluşan bu merozoitlerde konak hücre zarını parçalıyarak serbest hale geçer ve dolaşımdaki eritrositlere girerek piroplasmları oluştururlar. Eritrositler içerisindeki bu piroplasmlar kan emme esnasında omurgasız ara konak olan kenelere nakledilirler. Alınan piroplasmlar kene bağırsağında gametositleri oluşturur ve bu gametositlerde kaynaşarak zigotları meydana getirirler. Daha sonra zigotlar farklılaşarak hareketli kinetlere dönüşür (zigot ve kinetler parazitin yaşam çemberindeki tek diploid dönemlerdir). Hareketli kinet hemolenf yoluyla kenenin tükrük bezlerine göç ederek burada aseksüel çoğalma yoluyla sporoblast ve sporozoitleri oluştururlar.

### 1.2.2. Omurgasız Ara Konaktaki (Vektör) Dönem

*Theileria annulata*'nın yaşam çemberindeki gametogoni ve sporogoni dönemleri omurgasız ara konak olan vektör kenelerde geçer. *T. annulata*'nın ixodid bir kene olan *Hyalomma detritum* tarafından nakledildiği ilk kez Cezayir de yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Sergent 1928). Daha sonraları, *T.annulata*'nın *Hyalomma* soyuna bağlı 15 kene türü tarafından doğal ya da deneysel olarak nakledilebildiği belirlenmiştir (Robinson 1982). Hastalığı nakleden keneler arasında en önemli olanları üç konuklu *Hyalomma anatolicum anatolicum* ve iki konuklu *Hyalomma detritum* keneleridir (Uilenberg 1981). *T. annulata*, keneler tarafından transtadial olarak nakledilir, yani keneler larva ya da nimf dönemlerinde enfekte hayvanlardan kan emerken aldıkları etkenleri, ancak kene gömlek değiştirip bir sonraki gelişme dönemine (nimf ya da olgun) geçtiğinde omurgalı konaklara nakledilebilirler. *Hyalomma excavatum* keneleri deneysel şartlarda *T. annulata*'yı nakletmelerine karşın doğal ortamda bu kenenin larva ve nimflerinin rodentlerden kan emmeleri sebebiyle olgunları hastalığı nakledememektedir (Barnett 1977). Keneler omurgalı konaktan kan emme esnasında enfekte eritrositleri alır, ancak parazitin keneler tarafından nakledilmesinde rol oynayan bir takım etmenler vardır; i) kene kan emmeye başladığı ilk dönemlerde aldığı enfekte eritrositlerin büyük bölümü lize olup parçalanmakta, ancak kenenin doymaya başladığı ileriki dönemlerde alınan parazitler yaşamını devam ettirebilmektedir. Buna bağlı olarak larva ve nimf dönemlerinde keneler olgun dönemlerine nazaran hayvan üzerinde daha az süre kalarak daha az kan emmektedirler. Bu sebeple larva ve nimf döneminde, olguna nazaran hem daha az enfekte eritrosit alınmakta hem de yaşamını devam ettirebilen etken sayısı daha az olmaktadır. ii) Ayrıca, barsak epitelyumunun yapısı ile barsak lümeninin durumu da kene türleri arasında farklılıklar göstermekte ve bu durum parazitin gelişmesine etki edebilmektedir. Kenelerin kan emerken aldıkları piroplaslardan gametositlerin oluşumu barsak lümeninde eritrositlerin lize edilerek parazitin serbest hale geçmesi ile başlar. Bununla birlikte, serbest hale geçen parazitlerin ne kadarının gametlere farklılaştığı ve gametogenezisi kontrol eden faktörlerin neler olduğu bilinmemektedir (Şekil 1.2).

Kene kan emip doyduktan sonraki bir ila dört gün içinde, barsak lümeninde ince, iğbenzeri mikrogamontlar oluşur (Schein 1975, Schein ve ark 1975). Mikrogamontlarda bulunan flagella benzeri çıkıntılarda sayıları dörde varabilen çekirdekçikler oluşur, bunlar daha sonra ayrılarak fili form yapılı mikrogametleri oluştururlar. Aynı zamanda, küre biçimindeki makrogametlerde bu aşamada oluşmuş durumdadır. Daha sonra makro ve mikrogametlerin kaynaşarak zigotları oluşturduğu varsayılmaktadır (Levine 1985, Schein ve ark 1975). Merkezlerinde vakuol benzeri yapılar bulunan zigotlar, kenenin doymasından

sonraki beşinci günden itibaren barsak epitelyumunda görülürler. Zigot oluşumundan sonra parazit çoğalarak önce tetrapoit ve bunu takibinde kinetlere farklılaşma esnasında polipoit formları oluşmaktadır. Daha sonra zigotlar değişime uğrayarak çomak şekilli kinetleri oluştururlar. Zigotun görülmesinden sonraki 12–15 gün içerisinde parazitin hareketli formu olan kinetler kenenin hemolenfine geçerek tükürük bezlerine doğru göç ederler (Schein ve Friedhoff 1978). Parazitin yaşam çemberinde tek diploid dönem zigot ve kinet dönemleridir. Kinet tükürük bezi acini hücresi (tip II ya da tip III) içinde değişime uğrayarak sporoblastlara dönüşür ve çekirdek bölünmesi başlar. Bu aşamada tip II ve tip III acini hücrelerinde parazitin oluşturduğu çok çekirdekli sinsitial yapıya bağlı olarak genişleme meydana gelir. Kene omurgalı konaktan kan eminceye kadar sporogoni dönemi başlamaz, yani enfekte acini hücreleri içinde parazitler sporoblast safhasında beklerler. Kenenin omurgalı konaktan kan emmeye başlaması ile sporoblastlar aktive olarak sporogoni dönemine geçer. Yapılan çalışmalarda, *Hyalomma anatolicum* olgunlarının tükürük bezlerindeki sporozoitlerin, kenenin hayvan üzerinde beslenmeye başlamasından sonraki 24 ila 48 saat (maksimum 72 saat) sonra oluştuğu belirtilmiştir (Singh ve ark 1979). Bir diğer çalışmada da, 37°C sıcaklık ve %95 nisbi nemde tutulan enfekte, olgun *Hyalomma excavatum* kenelerinin kan emmelerine gerek kalmadan tükürük bezlerinde sporozoit gelişimi olduğu gösterilmiştir (Samish 1977). Bu da hastalığın naklinde rol oynayan bazı kenelerin omurgalı konaktan kan emmeye başlamadan önce tükürük bezlerinde sporozoitlerin gelişmiş olabileceğini akla getirmektedir. Kenede sporogoni dönemi başladıktan sonra oluşan sporozoitler kenenin acini hücrelerinde dejenerasyona yol açıp kenenin tükürüğünde serbest halde geçerler. Her bir enfekte acini hücresinde tahmini olarak 40 bin sporozoit oluşabilmektedir (Young ve ark 1992). Kene kan emme esnasında oluşan sporozoitleri bir anda değilde fasılalı olarak konak vücuduna vermektedir. *T. annulata*'nın yaşam çemberindeki görülen farklı dönemlerin moleküler olarak nasıl kontrol altında tutulduğu tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Bununla birlikte, sporogoni ve lökositlerdeki merogoni dönemleri ile eritrositler içinde piroplazmlara farklılaşma morfolojik olarak benzer bir mekanizmayla oluşmakta ve bununla *T. annulata*'nın genomundaki belli bir gen grubu tarafında kontrol edilebileceği ileri sürülmekte ve bir takım modeller geliştirilmektedir (Shaw ve Tilney 1992, Shiels 1999).

### 1.3. *Theileria annulata*'nın genomu

*Theileria annulata*, *T. parva* gibi kenelerdeki zigot dönemindeki diploit faz dışında haploit genoma sahiptir. *T. annulata* büyüklükleri 1,9 ila 2,6 Mb arasında değişen ve her birinde 3,792 protein kodlayan bölgeye sahip olduğu tahmin edilen dört kromozomdan oluşan 8.35 Mb'lık çekirdek genomuna sahiptir (Pain ve ark 2005). *T. parva*'nın genomu, *T.annulata*'ya nazaran biraz daha küçük (8.31 Mb) olmasına karşın 238 ekstra protein kodlayan gen vardır.

İlave olarak, *T. annulata* 6.5 kb büyüklüğünde, linear bir ekstra-kromozomal DNA'ya sahiptir (Hall ve ark 1990), bununla birlikte apikoplast gen dizilimi *T. parva* için belirlenmişken (Gardner ve ark 2005) *T. annulata*'nın apikoplast genom dizilimi belirlenmemiştir.

### 1.4. Tropikal Theileriosis de Klinik Bulgular ve Patogenez

Sığırlarda, *T. annulata* enfeksiyonlarının şiddeti hayvan ırklarının enfeksiyona karşı duyarlılığına (Rafyi ve ark 1965), enfeksiyona sebep olan parazit suşunun virulensine (Sergent 1945) ve enfekte kene tarafından inokule edilen sporozoit sayısına (Preston ve ark 1992) bağlıdır. *T. annulata* enfeksiyonu görülen klinik belirtilere göre hafif, perakut, akut, sub akut ve kronik olarak sınıflandırılabilir (Neitz 1957, Sergent 1945). Perakut vakalarda, hastalığa duyarlı hayvanlarda enfeksiyonun alınmasından sonraki üç ila beş gün içerisinde ölüm görülür. Hastalığa karşı bağışık hayvanlarda (pasif ya da aşılama sonucu) ise klinik bulgular hafiftir veya hiç görülmez ve hayvanlarda kendiliğinden iyileşme görülür (Pipano 2006).

Hastalığın patogenezinde hem lökositler içindeki şizogoni dönemi hem de eritrositler içindeki piroplazmlar etkilidir (Irvin 1987). Buna ek olarak, şizontlarla enfekte hücrelerdeki proliferasyon ve sitokin üretimi hastalığın patogenezinde önemli rol oynar (Preston ve ark 1993). Hastalığın inkubasyon periyodu (kenenin kan emmeye başlamasından ateşin ilk kez görülmesi arasındaki süre) ortalama iki hafta (8–30 gün) dır (Neitz 1957, Sergent 1945). Ateşin görülmesinden bir ila iki gün öncesinde kenenin kan emdiği taraftaki yüzeysel lenf yumrularında büyüme görülür ve bu lenf yumrularından hazırlanan biopsi örneklerinde hipertrofik lenfositler, monositik hücreler ve şizontlar görülür. Tropikal theileriosis'de gözlenen ateş, iştahsızlık (genelde hastalığın başlangıcında değişken bir iştahsızlık şeklindedir), ruminasyonun durması, salya akıntısı, burunda seröz akıntı, göz kapaklarında büyüme, lakrimasyon, nabız artışı, süt veriminde azalma ve az oranda sinirsel belirtiler akut vakalarda görülen en belirgin klinik bulgulardır (Khanna ve ark 1980). Ateşin yükselmeye

başladığı ilk dönemlerde dışkı normaldir, ancak hastalığın ilerleyen dönemlerinde dışkıda kan ve mukus gözlenir (Barnett 1977). Hayvanlarda belirgin derecede zayıflama ve süt veriminde düşüş önemli belirtiler arasında yer almaktadır.

Lokal lenf yumrusunda büyüme hastalığın klinik belirtileri gözlenmeden önceki en belirgin bulgudur. Bu dönemde lenf yumrularında parazitle enfekte hücreler ve genel hücre sayısında artış oluşur (Irvin 1987). Sporozoitlerin omurgalı konağa inokule edilmesinden sonraki beşinci günde yüzeysel lenf yumrularında makroşizontlar, dokuzuncu günde kanda piroplazmlar görülebilir. Hastalık esnasında dolaşımdaki lenfosit ve nötrofil sayısındaki azalmaya bağlı şiddetli bir lökopeni (Laiblin 1978, Preston ve ark 1992a) ve parazitemi esnasında eritrosit sayısında azalmaya bağlı şiddetli anemi görülür. İlerleyen anemiye bağlı hayvanlarda belirgin solunum güçlüğü oluşur. Yapılan çalışmalarda eritrositlerin %90'ının parazitlerce enfekte olabileceği belirlenmiştir. Enfekte eritrositlerin hem parazit tarafından parçalanarak lize olması hem de bu enfekte eritrositlerin dalak ve karaciğerde yıkımlanmasına bağlı aneminin şiddeti giderek artar (Hooshmand-Rad 1976, Uilenberg 1981, Barnett 1977). Hastalığın patogeneğinde oto immün mekanizmaların rol oynayabileceği düşünülmektedir (Hooshmand-Rad 1976). Duyarlı sığırlarda mortalite oranı parazitin virulensine bağlı olarak %40–60 arasında değiştiği bildirilmektedir. Ölüm genelde klinik bulguların görülmesinden sonraki bir ila iki hafta içinde görülür (Uilenberg 1981). Hastalığı atlatan hayvanlar ise parazite uzun süre taşıyıcılık yaparlar (Sergent 1945).

Hastalıkta görülen patolojik bulgular lenfatik ve vasküler sistemler ile ilişkilidir (Neitz 1957, Pipano ve ark 1974, Sergent 1945). Lezyonların şiddeti hastalığın seyriyle bağlantılıdır. En belirgin makroskobik lezyonlar subkutan doku ve serozalarda peteşi, yüzeysel ve derin lenf yumrularında hiperplazi, splenomegali, karaciğerde genişleme ve sarımsı renk oluşumu, sidik kesesinde büyüme, epi-endokardiyal peteşi ve ekimozlar, böbrek korteksinde gri-beyaz odaklar olarak sıralanabilir. Hastalığın karakteristik bulgularından biride abomasumda görülen ortası nekrotik, çevresi hemorajik bir alanla çevrili sigara yanığı şeklindeki ülserlerdir. Benzeri ülserlere küçük ve büyük barsak boyunca rastlanabilir. Akciğerler genelde ödemlidir.

Parazitin şizogoni döneminde enfekte konak hücrelerinde meydana getirdiği klonal çoğalmaya bağlı olarak lenfatik dolaşım ile tüm vücuda yayılan enfekte lenfositlerin metastazik özellikleri ile bunlara karşı gelişen yangısal cevabın patogeneğinde gözlenen bu makroskobik bulgular ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Akut durumlarda, şizontlarla enfekte hücreler enfeksiyonun verildiği taraftaki lenf yumrularından hızlı bir şekilde diğer lenf yumruları (mezenterik, mediastinal vb.) ile dalak ve timusa yayılırlar. Akut durumlarda, parazitle

enfekte hücreler dokuzuncu günde karaciğer, böbrek, akciğer, abomasum, adrenal ve hipofiz bezlerinde, on ikinci günde beyine ve on dördüncü günde kalp dokusuna yayılırlar (Forsyth ve ark 1999). Enfekte hücrelerin bu metastazik özellikleri eksprese ettikleri matriks metalloproteinazlar (MMP) (Baylis ve ark 1992, Somerville ve ark 1998a) ile CD2, CD11b, VLA-4 (very late antigen-4) ve CD9 gibi adezyon moleküllerine bağlı olabilir (Forsyth ve ark 1999c). Ayrıca, tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır (Brown ve ark 1995, Forsyth ve ark 1999a, Preston ve ark 1993). Enfekte makrofajlarca TNF- $\alpha$ 'nın yoğun oranda üretimi hastalığın belirgin bulguları olan lökopeni, peteşi ve ekimoz oluşumu ile bağlantılıdır. Şiddetli enfeksiyonlarda görülen yüksek interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) oranı da TNF- $\alpha$  üretimini indükleyebilmektedir (Campbell ve ark 1997a,b).

### 1.5. Tropikal Theileriosis de Bağışıklık

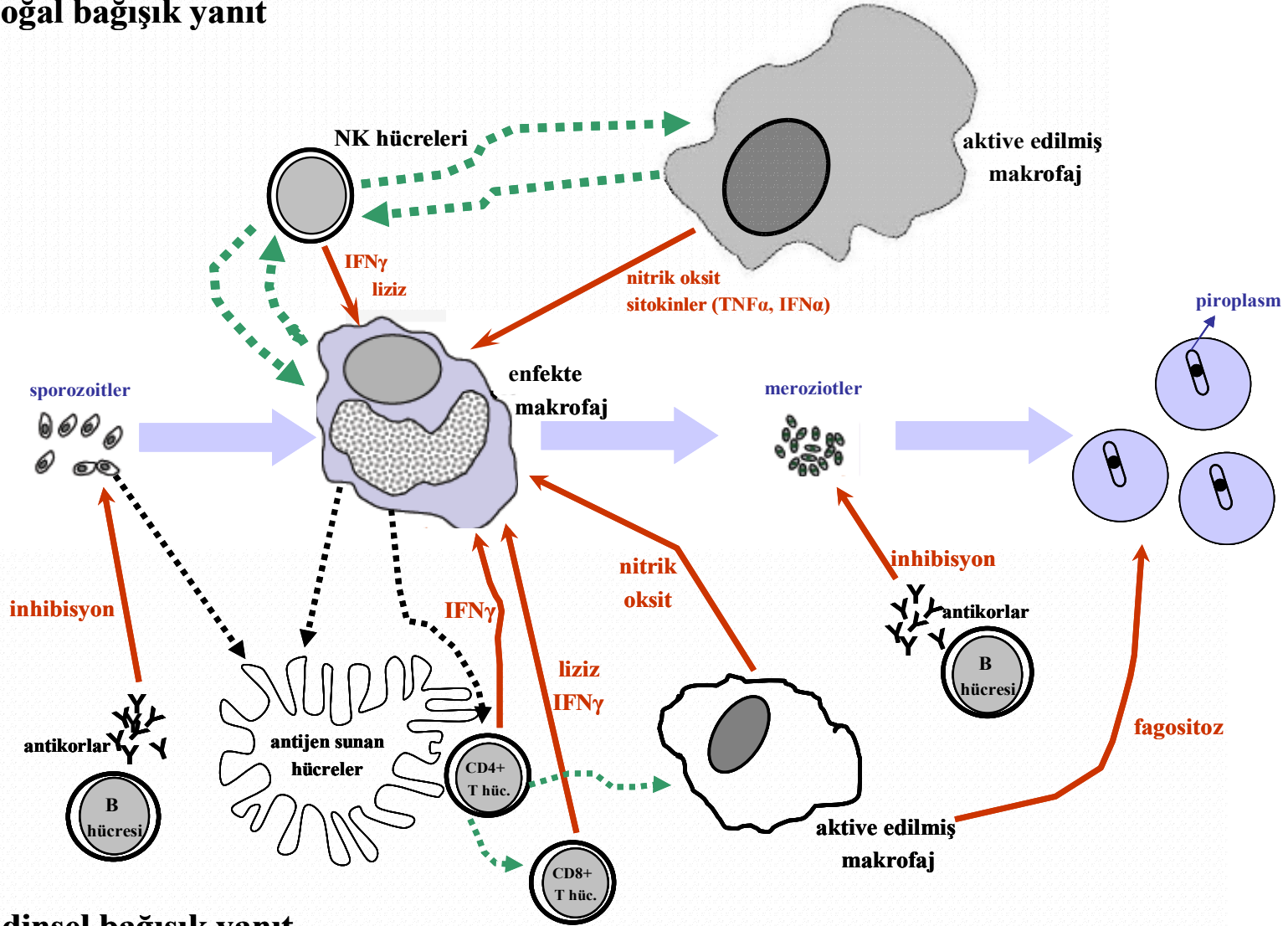
*Theileria annulata*'nın omurgalı konakta hem hücre içi (şizont, piroplazm) hemde hücre dışı (sporozoit, merozoit) formları görülür. Buna bağlı olarakta konak bağışıklık sistemi parazitin yaşam döngüsündeki farklı dönemlerine ait antijenlerle karşılaşmakta ve bu da içerisinde hem humoral hemde hücresel komponentleri içeren heterojen bir yanıtı sebep olmaktadır (Boulter ve Hall 1999). Her iki durumda da enfeksiyondan kurtulan hayvanlarda homolog suşlara karşı tam, heterolog suşlar ile reenfeksiyonlara karşı ise kısmi bir bağışıklık gelişir (Hall 1988). Tropikal theileriosis'e karşı edinilen bağışıklık enfeksiyonun oluşma yoluna (enfekte keneler, sporozoit stabilatları yada attenüye hücre kültürleri yoluyla) bakmazsızın gelişir (Pipano ve ark 1981). Yerli ırkların tropikal theileriosis'e karşı direnci ve hücre kültürü aşılmasının duyarlı ırkları korumada başarılı oluşu bir arada düşünüldüğünde, sığır bağışıklık sisteminin oluşan birincil ve ikincil enfeksiyonlara karşı etkili bir yanıt geliştirdiğini göstermektedir. Bu sonuçlara bakarak, dirençli ırklar hastalığa karşı belli düzeyde doğal bağışıklığa sahipken, aşılanmış egzotik ırklarda hastalığa karşı birincil enfeksiyona yada aşılama ya bağlı gelişen kazanılmış bağışıklık söz konusudur. Bununla birlikte, *T. parva*'da asıl olarak görülen sitotoksik T hücre yanıtı nazaran tropikal theileriosis'e karşı doğal ve edinsel bağışık yanıt bir arada uyum içerisinde gelişmektedir.



### 1.5.1. Doğal Bağışık Yanıt

*In vitro* ortamda, sporozoitlerin monositik hücreler ile B hücrelerine, T hücrelerine kıyasla daha fazla invaze olup, onları transforme ettikleri yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Sager ve ark 1997, Sager ve ark 1998). Makroşizontlar ile enfekte mononükleer hücrelerdeki mRNA sitokin profili enfekte olmamış aktif makrofajlara benzer şekilde gelişmektedir (Preston ve ark 1999). Bunun yanında enfekte hücreler, enfekte olmamış ‘sitostatik’ makrofajları aktive ederek bu hücreler tarafından sitokin, nitrik oksit (NO) ve bazı faktörlerin salınmasına ve bu sayede de enfekte hücrelerin çoğalmasını baskılayabilmektedirler (Preston ve Brown 1988). Doğal öldürücü (NK) hücreler de uyarılarak IFN- $\alpha$  salgılanması yoluyla makroşizont ile enfekte hücreleri yok etmektedirler (Preston ve ark 1983). Bu iki hücre tipi oluşturulan doğal bağışık yanıt Şekil 1.3’de gösterilmiştir. NK hücreleri aynı zamanda enfekte hücreler tarafından salgılanan sitokinler yardımı ile IFN- $\gamma$  üretimi için uyarılarak, enfekte olmamış makrofajlarda NO üretimini kuvvetlendirici bir etki yapabilmektedir (Preston ve ark 1999). NO’nin *in vitro* koşullarda makroşizontlar ile enfekte hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozisi indüklediği, bu sayede merozoitlere farklılaşmayı engellediği gösterilmiştir (Richardson ve ark 1998). Aynı zamanda, NO *in vitro* ortamda hücrelerin sporozoitler ile invazyonunu engellediği gösterilmiş (Visser ve ark 1995) ve bu etkinin *in vivo* koşullarda da sporozoit ve merozoit invazyonunu engelleyebileceği öne sürülmüştür (Preston ve ark 1999). İleri sürülen bir diğer görüşte, doğal bağışık yanıtın direk uyarımının düşük dozlarda oluşan enfeksiyonların kontrolünde yardımcı bir etki yaparak parazitin hücre içine yerleşmesini önleyerek sublinik enfeksiyonlara yol açtığıdır (Preston ve ark 1999). Bununla birlikte, sığırlarda yüksek dozlarda sporozoitlerin verilmesi sonucu oluşan enfeksiyonlarda parazitin sonraki dönemlerinden korunma ve bu safhaların elimine edilebilmesi için edinsel bağışık yanıtı ihtiyaç duyulmaktadır. Doğal ve edinsel bağışıklık arasındaki bu etkileşim belli bir sıra halinde değil birbiri içerisine geçmiş ve biri diğerinin tamamlayıcısı yada yardımcısı olacak şekilde oluşmaktadır.

## Doğal bağışık yanıt



Şekil 1.3. Tropikal theileriosis'e karşı sığırlarda gelişen doğal ve edinsel yanıt (*Devam*)

**Şekil 1.3.** Tropikal theileriosis'e karşı sığırlarda gelişen doğal ve edinsel yanıt; Parazitin omurgalı ara konaktaki tüm gelişme dönemlerinde (sporozoit, şizont, merozoit ve piroplasm) bağışıklık sistemi ile karşılaşmaktadır. NK (doğal katil) hücreler ve aktive edilmiş makrofajlar trofozoit ve makrofajlar ile enfekte lökositlere etkiyerek doğal bağışık yanıtı şekillendirmektedir. NK hücreleri hem enfekte hücreleri lize ederken hemde salgıladıkları tümör neroz faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) ve nitrik oksit yardımı ile aktive edilmiş makrofajları yönlendirmektedirler. Hastalığa karşı oluşan edinsel bağışık yanıtta sitotoksik CD8<sup>+</sup> T hücreleri makroşizontlar ile enfekte hücreleri lize ederken, CD4<sup>+</sup> T hücreleride antijenler ile uyarıldıktan sonra makrofajları aktive etmektedirler. İkincil enfeksiyonlar sırasında oluşan sporozoit ve merozoitler B hücreleri tarafından üretilen antikorlar yardımı ile inhibe edilebilmektedir. Hem CD4<sup>+</sup> hem de CD8<sup>+</sup> hücreleri tarafından üretilen interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) direk olarak trofozoitler üzerine etki etmekte, bununla birlikte makroşizontla enfekte hücreler birincil enfeksiyon döneminde gelişen yanıtta oluşan CD8<sup>+</sup> T hücreleri tarafından lize edilebilmektedir. Aktive edilmiş makrofajlar piroplasmalar ile enfekte hücreleri fagosite etmektedirler (Preston ve ark (1999)'dan uyarlanmıştır).

## 1.5.2. Edinsel Bağışık Yanıt

### 1.5.2.1. Hücresel Bağışıklık

Tropikal theileriosis'e karşı gelişen edinsel bağışık yanıt hem B, hemde T hücrelerinin uyarılmasını içermektedir, ancak bu güne kadar yapılan çelişmalarda koruyucu bağışıklıkta rol oynayan parazit antijenleri tam olarak belirlenebilmiş değildir. Ayrıca, enfekte lökositlerin makrofajları hangi yolla aktive ederek edinsel yanıtın oluşmasını indükledikleri de bilinmemektedir. Edinsel bağışık yanıtta rol oynayan makrofajlar ile NK hücreleri arasındaki döngüde hem CD4<sup>+</sup> hemde CD8<sup>+</sup> hücreleri tarafından salgılanan ve aralarında IFN- $\gamma$ 'nın da bulunduğu sitokinler rol oynamaktadır (Preston ve ark 1999). *In vitro* ortamda, IFN- $\gamma$ 'nın bu etkisini makrofajlar tarafından TNF- $\alpha$  ve NO'nin sentezlenmesini artırarak yaptığı bulunmuştur (Preston ve ark 1993, Visser ve ark 1995). Aktif haldeki makrofajlar tarafından üretilen NO enfekte lökositler üzerine etkimekte ve aynı zamanda bu etkilerini serbest merozoitler ve enfekte eritrositler üzerinde de gösterebilmektedir. Aynı zamanda makrofajlar enfekte eritrositleri fagositoz yoluyla direkt olarak yok edebilmektedirler. Çoğu hücrenin yüzeyinde bulunan MHC sınıf I molekülleri, yüzeylerinde endojen parazit proteinlerinin işlenmesi ile oluşturulan kısa peptid zincirlerini sunarak bu hücrelerin enfekte oldukları gösteren belirteçlerdir. CD8<sup>+</sup> sitotoksik T hücrelerinin MHC sınıf I moleküllerince sunulan bu antijenleri belirleyerek *T. annulata*'ya karşı gelişen bağışıklıkta rol alan önemli araçlar oldukları düşünülmektedir (Ahmed ve ark 1989). Yapılan çalışmada, oluşan birincil enfeksiyon sırasında sitotoksik hücrelerin sadece enfeksiyonu atlamanın hayvanların dolaşım ve lenf yumrularında belirlenebildiği gösterilmiştir (Innes ve ark 1989, Preston ve ark 1983). *T.annulata* enfeksiyonlarına karşı oluşan sitotoksik yanıtın MHC aracılı olduğunu belirtmişlerdir. Otolog yada allogenik hücre kültürleri kullanılarak aşılamanın iki grup sığırdaki; allogenik hücrelerle aşılamanın gruptaki hayvanlarda hafif klinik bulgular gelişirken, autolog enfekte hücrelerle aşılamanın diğer gruptaki hayvanlarda şiddetli bir yanıt oluşmuştur. İkinci grupta yer alan hayvanlarda parazite karşı bir sitotoksikite gelişirken, ilk grupta yabancı sığır hücreleri ile aşılamanın hayvanlarda parazite karşı gelişen ikincil sitotoksikiteden önce yabancı hücrelerdeki MHC antijenlerine karşı bir sitotoksikite gelişmiştir. Tüm hayvanların bağışık yanıtta gelişen çapraz reaksiyonları doğrulayan tarzda, heterolog sporozoitler ile oluşturulan enfeksiyonlara karşı bağışık olduğu görülmüştür. Makrofitler ile enfekte hücreleri lize edebildiği halde akut enfeksiyonlarda CD8<sup>+</sup> sitotoksik T hücrelerinin dolaşımında kısa süreli olarak bulunduğu, bunun aksine bu hücrelere karşı gelişen makrofaj aktivitesinin ise uzun süre devam ettiği gözlenmiştir (Innes ve ark 1989). Makrofajların enfekte lökositlere karşı

geliştirdiği uzun süreli aktiviteye bağlı olarak, hücre kültürleri ile aşılama sonucu hayvanlarda koruyucu bağışıklığın oluşmasında daha önemli rol oynadıkları öne sürülmüştür (Preston ve Brown 1988, Preston ve ark 1999). İkincil enfeksiyonlara karşı oluşan yanıtta makrofajları aktive edebilme kabiliyetine sahip CD<sup>+</sup> bellek hücrelerinin hızlı şekilde geri çağırılmaları ile ilişkilidir.

*Theileria parva*'da, CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin enfeksiyonun kontrolünde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (McKeever ve ark 1994). Aynı zamanda, sitotoksik T lenfositlerin (CTL) yüksek özgüllükle sadece şizontlar ile enfekte hücreleri belirlediği ve CTL yanıtın parazit suşuna özgü olarak geliştiği bilinmektedir (Morrison ve ark 1987a,b, Morrison 1996, Morrison ve ark 1996). Antijenlere özgü gelişen CD8<sup>+</sup> T hücre aracılı IFN- $\gamma$  yanıt ile CD8<sup>+</sup> CTL aktivitesinin incelenmesi amacıyla yapılan deneylerde antijenler kullanılarak aşılama hayvanların çoğunda öldürücü dozlarla sporozoitler verilerek oluşturulan ikincil enfeksiyonlara karşı IFN- $\gamma$  yanıt gözlenirken, az oranda hayvanda CTL aktivitesi görülmüş ve öldürücü dozlardan sonra hayvanlarda oluşan CTL yanıtın hayvanların hayatta kalabilmeleri ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (Taracha ve ark 1995).

*Theileria annulata*'ya karşı hücre aracılı koruyucu bağışıklığın gelişmesinde enfekte hücre yüzeyinde sunulan parazit aracılı antijenler önemli olduğu ve bu peptidlerin CTL hücrelerine MHC sınıf I molekülleri tarafından sunulup şizontların eliminasyonunun ardından bu peptidlerinde yok olduğu belirlenmiştir (Seitzer ve Ahmed 2008). MHC sınıf I aracılı CTL yanıt sadece bağışık hayvanlarda gelişirken, hasta yada duyarlı olanlarla da bu yanıt rastlanmayacağı vurgulanmıştır (Seitzer ve Ahmed 2008). Aşılı hayvanlarda gelişen korumanın heterolog suşlara karşı zayıf olmasında oluşan CTL yanıtın farklı suşlara özgü olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiş (Darghouth 2008) ve yapılan çalışmada aşılama hayvanlar da oluşan A-10 aracılı CD8 T hücre yanıtın parazit suşlarına özgü olduğu, bununla birlikte hem bağışık yanıt oluşan populasyon içinde hemde klonlanmamış parazit populasyonunda ki farklı hedef antijenlerde, suşlara özgü CD8 T hücrelerinin heterojenite gösterdiği belirlenmiştir (Machugh ND ve ark 2008).

### 1.5.2.2. Humoral Bağışıklık

*Theileria annulata* ile enfekte hayvanlarda etkili bir primer immün yanıtın gelişmemesi bağışıklığın gelişmesinde parazitlerin direk etkilerini akla getirmektedir. Enfeksiyon esnasında CD4<sup>+</sup> hücreleri, parakortekste yer alan antijen sunan hücreler ile etkileşim kurmak yerine medulla kısmında bulunan gelişmekte olan enfekte hücreler tarafında aktive edilmektedir. Bunun yanında parazit aracılı kontrolsüz IFN gamma üretiminin de lokal antikor yanıt oluşmaması üzerine etkili olabileceği düşünülmektedir (Campbell ve ark 1997b).

Oluşan birincil enfeksiyon sırasında sığır bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen antikorlar ne enfekte lökositleri nede eritrositleri tanıyamamakta (Ahmed ve ark 1988, Hall 1988, Shiels ve ark 1989) ve bu sebeple oluşan antikorlar parazitin bu dönemlerine karşı koruyucu bağışıklıkta rol oynamamaktadır. Bununla birlikte, bağışık serumun *in vitro* koşullarda sporozoit invazyonunu engellediği gösterilmiştir (Gray ve Brown 1981, Preston ve Brown 1985). Re enfeksiyon sonrası, sporozoitlere karşı oluşan antikorların konak hücrelerinin sporozoitler tarafından invazyonunu durdurmasının mümkün olduğu, ancak enfeksiyonu atlatan hayvanlarda asıl direncin parazite özgü CD4<sup>+</sup> bellek T hücrelerinin makrofaj aktivasyonunu artırması ve doğal bağışık yanıtın hızlı gelişmesine bağlı olduğu söylenmektedir (Preston ve Jongejan 1999). *In vivo* koşullarda ise sporozoitler ancak tekrarlı enfekte kene ile enfestasyona maruz kalmaya bağlı oluşan yüksek antikor titrelerinde etkilenmektedirler (Preston ve Brown 1985). Bu durum sporozoitlerin dolaşımında çok kısa süreler kalmasına bağlı olarak bağışıklık sistem hücreleri ile karşılaşma sürelerinin az olması ile açıklanabilmesine rağmen, ilginç şekilde sporozoitlere karşı gelişen antikorlar torfozoitler ile enfekte hücrelerin klonal olarak çoğalabilen makroşizontlara farklılaşmalarında yavaşlamaya sebep olabilmektedirler (Preston ve Brown 1985).

Enfekte makrofajlar tarafından üretilen sitokinler muhtemelen doğal bağışıklığı indükler ve CD4<sup>+</sup> T hücrelerine antijen sunulmasına yardımcı olurlar. CD4<sup>+</sup> T hücreleri, hem makrofajları aktive eden IFN-gama ve CD8<sup>+</sup> T hücre çoğalmasını arttıran interleukin 2 (IL2) üretip hemde parazitin hücre dışı dönemleri olan merozoitler ve hücre içi piroplasmaları nitrik oksit (NO) ile birlikte öldüren antikorların B hücrelerince üretimine yardımcı olurlar (Preston ve Jongejan 1999).

Merozoitlere karşı *in vivo* olarak gelişen antikor varlığı bilinmektedir (Irvin and Morrison 1987), ayrıca bağışık serumların serbest merozoitleri tanıma özellikleride yapılan çalışmada gösterilmiştir (Ahmed ve ark 1988) ve bunlar sadece komplement aktivasyonu

yoluyla lize olabilmektedirler. Bununla birlikte, bu çalışmada bağışık serumun *in vitro* ortamda enfekte hücre çoğalmasına inhibe edici bir etkisinin olmadığını gösterilmiştir. *T.parva* enfeksiyonlarında gelişen immün yanıtın hastalığın klinik belirtilerini azaltma üzerine bir etkisinin olmadığı ve duyarlı hayvanlara immün serum yada globulin verilmesinin re enfeksiyonlar sonrası oluşan klinik tabloyu etkilemediği hayvanlarda kontrol grubuna benzer şiddetli tablo oluştuğu belirlenmiştir (Muhammed ve ark 1975). Aşılama veya doğal yolla gelişen bağışıklıkta sporozoit ve merozoitlere karşı gelişen antikorların etkisi üzerine pek fazla veri yoktur (Hall 1988, Irvin 1985). Etkinliği hangi yolla verildiğine bağlı olarak değişse de rekombinant sporozoit veya merozoit yüzey antijenleri kullanılarak yapılan aşılama hayvanları sporozoit yada enfekte kan stabilatları ile oluşturulan re enfeksiyonlara karşı kısmi olarak koruyabilmektedir. Bu yanıtın başlatılması ve gelişmesinde CD4<sup>+</sup> T hücre yardımına gereksinim olduğu bilinmekte, aynı zamanda naif ve bellek sitotokik T hücreleri belirgin şekilde bu yardıma gereksinim duymaktadırlar. CD4<sup>+</sup> T hücre yanıtı aynı zamanda bağışık hayvanlarda da oluşmakta ve bu CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin bazıları sitolitik özellik göstermektedir (Preston ve Brown 1985).

## 1.6. Türkiye’ de Tropikal Theileriosis’ in Epidemiyolojisi

Türkiye 36–42° kuzey enlemleri ve 26–45° doğu boylamları arasında yer alan, 1,660 kilometre eninde, 814.578 metrekare yüzölçümüne sahip, Avrupa ile Asya kıtaları arasında bir köprü vazifesi gören bir ülkedir. Türkiye hem coğrafik hemde iklimsel olarak birbirinden farklı yedi bölgeye (Marmara, Ege, Akdeniz, Karadeniz, İç Anadolu, Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu) ayrılmıştır (Şekil 1.4).

Tropikal theileriosis, ülkemiz sığırlarında görülen önemli hastalıklardan biridir ve hastalığa bütün coğrafik bölgelerde rastlanmaktadır (Sayın ve ark 2003). Mayıs ve Eylül ayları hastalığın en yoğun olarak rastlandığı dönemdir, yaz ortasında ise enfekte olmuş erişkin kenelerin sayısındaki artışına bağlı olarak hastalık pik yapmaktadır (Sayın ve ark 2003). Ülkemizde hastalığın naklinde rol oynayan, *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *H. anatolicum excavatum*, *H. detritum* ve *H. Marginatum* olmak üzere dört kene türü bulunmaktadır (Aktaş 2004). Bu kene türlerinin hastalığın naklinde rol oynadıkları ve dört tür arasında oluşan enfeksiyon oranları arasında herhangi bir fark olmadığı belirlenmiştir (Sayın ve ark 2003). *Hyalomma detritum* dışındaki kene türleri üç konakçılı özellik gösterirken, *H. detritum* iki konaklı özellik göstermektedir. Türkiye’nin iç ve doğu bölgelerini içine alan coğrafik alanda hastalığın epidemiyolojisi ile naklinde rol alan kene türlerinin belirlenmesi amacıyla yapılmış birçok çalışma mevcuttur.



Şekil 1.4. Türkiye’de bulunan farklı coğrafik bölgeler, bunların içerisinde yer alan bölümler ile Ege bölgesinin biyoklimatik alanları (*Devam*)



**Şekil 1.4.** Türkiye’de bulunan farklı coğrafik bölgeler, bunların içerisinde yer alan bölümler ile Ege bölgesinin biyoklimatik alanları. Ülkenin doğusunda yer alan Doğu Anadolu Bölgesi; Yukarı Fırat, Erzurum–Kars, Van ve Hakkari olmak üzere dört bölüme ayrılmıştır. Güney batı kısmında yer alan Güneydoğu Anadolu Bölgesi; Orta Fırat ve Dicle olarak iki bölümdür. Orta kısımda yer alan İç Anadolu bölgesi kendi içinde Yukarı ve Orta Kızılırmak ile Konya ve Yukarı Sakarya bölümlerinden oluşmaktadır. Karadeniz ile kıyı sınırı olan ve kuzeyde kalan Karadeniz Bölgesi; Batı, Orta ve Doğu olmak üzere üç bölümden oluşur. Ülkenin kuzey batısında yer alan, hem Ege hemde Marmara Denizine kıyısı olan ve Anadolu ile Avrupa topraklarını içerisinde barındıran Marmara Bölgesinde; Güney Marmara, Çatalca–Kocaeli, Ergene ve Yıldız Dağları olmak üzere dört bölüm yer almaktadır. Ülkenin güneyinde yer alan ve Akdeniz ile kıyı komşusu olan Akdeniz Bölgesi ise; Antalya ve Adana olmak üzere iki bölüme ayrılmıştır. En batıda yer alan ve Ege Denizine kıyısı olan Ege Bölgesi ise kendi içerisinde İç Batı Anadolu ve Ege olarak iki bölümden oluşmaktadır. İç Batı Anadolu iklimsel olarak İç Anadolu Bölgesine benzerlik göstermektedir; kışın karlı ve soğuk, yazın sıcak ve kuraktır. İlkbahar serin ve yağışlı, sonbahar ise ılık ve az yağışlıdır. Ormanlık bölgeler az oranda olup, dağlık yaylalar ve ovalık vadiler içerir. Ege Bölümü ise iklimsel olarak; yazları sıcak ve kurak, kışları ılık ve yağışlı geçer. İlkbahar ve sonbahar ayları ılıman ve ortalama yağışların en yoğun yaşandığı aylardır. Ege Bölümü kıyı kesimlerde yaz aylarında sıcak ve nemli bir iklime sahipken, denize dik dağları, yaylaları ile Gediz, Büyük ve Küçük Menderes ile Bakır çayları bölgenin önemli su kaynaklarını oluşturur.

Türkiye'nin beş farklı bölgesinde tropikal theileriosis'in seroprevalansının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, hastlığa en yoğun (%91,4) olarak Güney Doğu Anadolu Bölgesi'nden toplanan örneklerde rastlanmıştır, bunu Karadeniz (%46,8), Ege (%40), Marmara (%33,3) ve İç Anadolu Bölgesi (%29) takip etmiştir (Eren ve ark 1995). Batı Karadeniz Bölgesinde ise % 11.56'lık oranla en yaygın olarak *T. buffeli/orientalis* grubuna bağlı etkenlere rastlanırken, *T. annulata* %1.28'lik oranla çok düşük düzeyde tespit edilebilmiştir (Altay ve ark 2008).

Adana ve yöresinde yapılan bir çalışmada IFA testi ile toplanan örneklerin %10,7'lik kısmında *T. annulata*'ya karşı antikor varlığı tespit edilmiştir (Çakmak ve Öz 1993). Ankara ve yöresinde yapılan bir diğer çalışmada 1990–93 yılları arasında toplanan örneklerin IFA testi ile incelenmesinde hayvanlarada toplam %50.7 oranında enfeksiyona rastlanırken, bunlardan %14.3'ünün yeni vaka olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada kan alınan hayvanların üzerinde *Hy. anaticum*, *Hy. anaticum excavatum*, *Hy. detritum* ve *Hy. marginatum* türü keneler belirlenmiş ve en yoğun kene enfestasyonunun yaşlı hayvanlarda görüldüğü belirtilmiştir (Sayın ve ark 2003). Türkiye'nin doğusunda yer alan Elazığ, Malatya, Bingöl, Muş, Van, Erzincan, Erzurum, Kars, Adıyaman, Diyarbakır ve Şanlıurfa illerini içine alan bölgede *T. annulata*'nın prevalansının PCR ile belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda hastalığa en yaygın olarak Diyarbakır (%74.6), Şanlıurfa (%60.3), Elazığ (%60.2), Bingöl (%61.7), Muş (%58.7), Adıyaman (%43.1) ve Van (%27.8) illerinde, en az oranda ise Erzurum, Kars ve Erzincan (%1.4–6) illerinde rastlanmıştır (Dumanli ve ark 2005). Yine Doğu Anadolu Bölgesinde yapılan bir çalışmada toplanan örneklerin % 39' unda *T. annulata* tespit edilirken, %7 oranında da sığırlarda apatojen olan *T. buffeli/orientalis* grubuna bağlı etkenler belirlenmiş ve aynı hayvanlar üzerinden *Hy. anaticum*, *Hy. anaticum excavatum*, *Boophilus annulatus*, *Rhiphicephalus bursa* ve *R. sanguineus* keneleri toplanmıştır (Aktaş ve ark 2006) Kayseri ve yöresinde sığırlar üzerinden toplanan kenelerin %21.12'sinin *Hy. anaticum* olduğu belirlenmiş ve bu kenelerin %9.3'ünde *T. annulata*'ya rastlanmıştır (İça ve ark 2007). Elazığ ve Malatya yöresinde sığırlardan ve barınak duvarlarından toplanan *Hyalomma* soyuna bağlı kenelerden en yoğun olarak *Hy. anaticum*'a (%63.1) rastlanmıştır ve bunu *Hy. an. excavatum* (%23.8) ve *Hy. detritum* (%11.7) takip etmiştir. Metilen yeşili ve pironin ile boyanan kene tükrük bezlerinin incelenmesi sonucunda en yoğun enfeksiyona *Hy. anaticum* (%50)'da rastlanırken bunu çok daha düşük oranlarla *Hy. an. excavatum* (%2.4) ve *Hy. detritum* (%4.6) türü keneler takip etmiştir (Aktaş ve ark 2004).

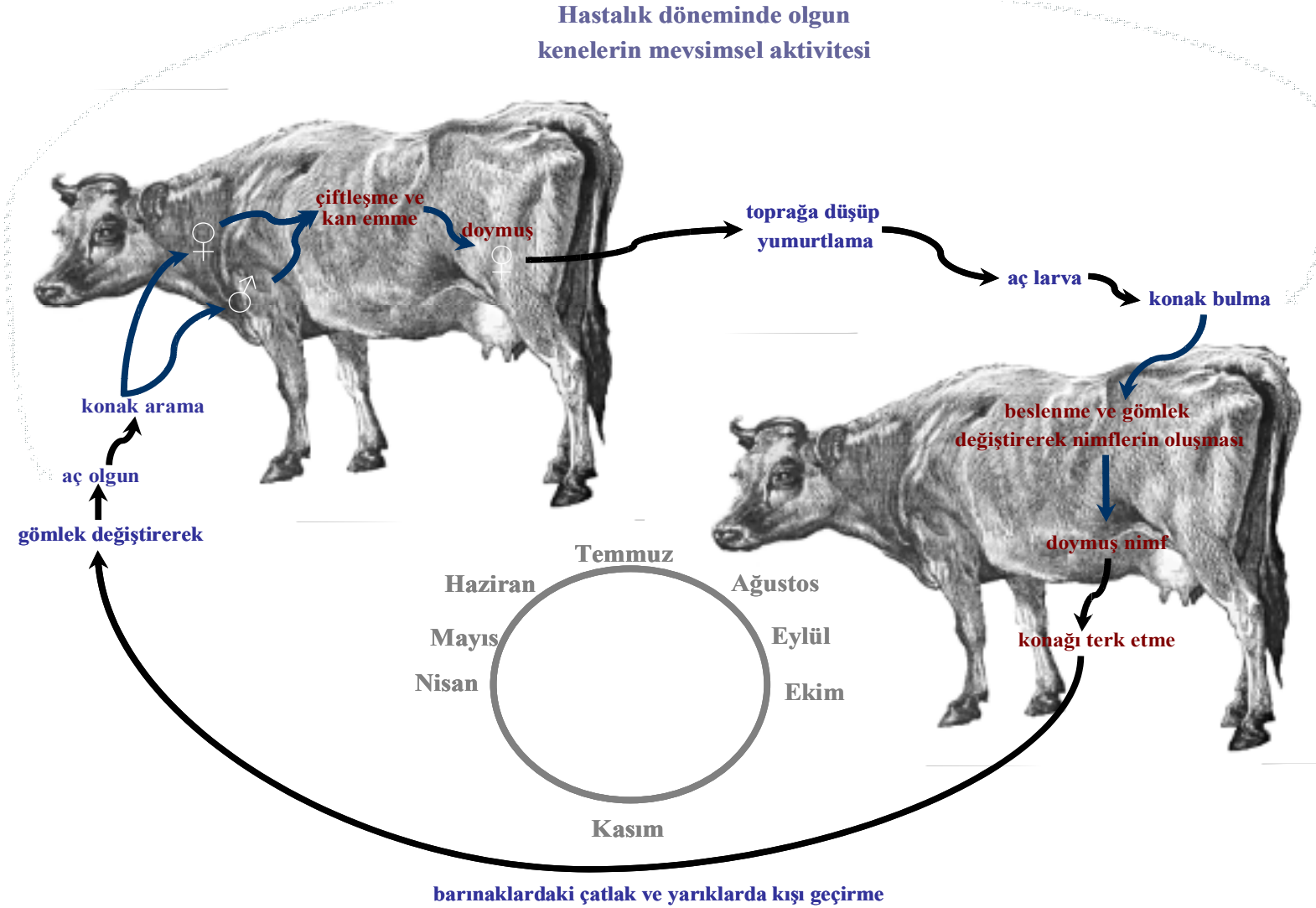
Ege Bölgesinde hastalığın epidemiyolojisi üzerine yapılan çalışmalarda bölgede hastalığın yaygın olarak görüldüğü belirlenmiştir (Eren ve ark 1998, Aysul ve ark 2008). Batı

Ege Bölgesinde sığırlarda görülen kene varlığının belirlenmesi Aydın, İzmir ve Manisa illerine bağlı ilçelerde yapılan kapsamlı çalışma sonucunda bölgede *Hyalomma* soyuna bağlı *Hy. anatolicum*, *Hy. anatolicum excavatum*, *Hy. detritum*, *Hy. marginatum* ve *Hy. rupifex* türü kenelere rastlanmıştır. Aydın ve yöresinde ise sığırlarda en yaygın olarak *Hy. marginatum* (%48.28)'a rastlanmış ve bunu *Hy. excavatum* (%25.27), *Hy. detritum* (%17.72) ve *Hy. anatolicum* (%1.24) türü keneler izlemiştir (Bakırcı 2009). Doğu Bölgesine nazaran Ege Bölgesindeki sığırlarda *Hyalomma marginatum* ve *Hy. excavatum* en yaygın kene türleri olarak tespit edilmiş, *Hy. anatolicum*'a ise oldukça düşük oranlarda rastlanmıştır. Barınak duvarlarından toplanan keneler incelendiğinde Aydın'da %91.43'lük oranla en yoğun *Hy. detritum*'a rastlanmıştır (Bakırcı 2008). Ege Bölgesinde hayvan üzerinden ve barınak duvarlarından toplanan kenelerdeki enfeksiyon oranları kapsamlı olarak belirlenmemiştir. Ancak yapılan incelemelerde özellikle Aydın ve yöresinde hastalığın naklinde rol alan başlıca kene türünün *Hy. detritum* olduğu gözlenmiştir (Karagöç T., yayınlanmamış veri).

Aydın ve yöresinde tropikal theileriosis' in naklinde birincil olarak rol oynayan *Hy. detritum* kenelerinin dişileri bir yaz döneminde yaklaşık olarak 4000 yumurta çıkartabilmekte ve bu yumurtalardan çıkan aç larvalarda kan emek için konak aramaktadır (Şekil 1.5). Konak üzerinde kan emerek doyan larva gömlek değiştirerek aç nimflere dönüşerek aynı konakta kan emmeye devam etmektedir. Sığırlarda yaz sonu ve sonbahar aylarında olgunlaşmamış dönemlerle enfestasyonu yaklaşık 3–4 haftada son bulmaktadır. Daha sonra, doymuş nimfler konaktan ayrılarak barınaklarda bulunan yarık ve çatlaklarda kışı geçirirler. Mayıs ve Haziran aylarında çevre şartlarının (hava sıcaklığı, nem) uygun hale gelmesi ile nimfler gömlek değiştirmeye başlayarak aç olgunlara dönüşerek kan emecek yeni konak aramaya başlarlar. Yeni konak üzerinde kan emmeye başlayan olgun dişi ve erkek keneler çiftleşirler. Dişi kene erkeğe nazaran daha uzun süre konak üzerinde kan emer (yaklaşık bir hafta). Çiftleşmiş dişi kene doyduktan sonra kan emmeyi bırakarak yumurtlamak amacıyla toprağa düşer ve yaşam döngüsünü tamamlar. Keneler hastalığı larva yada nimf dönemlerinde alarak bir sonraki yaşam döneminde kan emdikleri konağa naklederler.

Seroloji ve/veya moleküler tabanlı olarak hastalığın epidemiyoloji üzerine yapılan çalışmalar her ne kadar hastalığın o bölgedeki varlığı hakkında bilgi versede, gerek o bölge yada il den toplanan kanların toplam hayvan varlığını temsil etmesinin gerekse de hastalığın yaygınlığı ve naklinde rol alan kene türlerinin mevsimsel aktivitelerinin belirlenmesinin gerekliliği tropikal theileriosis'e karşı ülkemizin risk alanlarının belirlenerek bu bölgelerde gerekli kontrol programlarının uygulanmasını zorunlu kılmaktadır. Bunlardan ayrı olarak hastalığın epidemiyolojisinde ve görüldüğü bölgedeki endemik stabilitenin oluşmasında etkili

olan bir diğer faktörde o bölgede gözlenen hastalık etkenlerinin farklı izolatlarının virülens farklılıklarıdır. Deneysel çalışmalarda hayvanlarda farklı *T. annulata* izolatu ile oluşturulan enfeksiyon sonucunda bu izolatlardan birinin virülens, üç tanesinin orta derecede virülens ve ikisinde hafif virulent olduğu gözlemlenmiştir (Sayın ve ark 2000). Sonuç olarak yapılan epidemiyolojik çalışmalarda hayvanlarda ve kenelerde hastalığın yaygınlığının araştırılmasının yanında hastalık oluşturan farklı izolatların virülens değerlerinin belirlenerek o bölgelerde oluşan endemik stabilitenin ve farklı bir izolata bağlı oluşabilecek yeni bir epideminin önüne geçilmesini sağlayacak verilerin elde edilmesinde büyük önem taşımaktadır.



Şekil 1.5. Aydın yöresinde *Hyalomma detritum*'un yaşam döngüsü (*Devam*)

**Şekil 1.5.** Aydın yöresinde *Hyalomma detritum*'un yaşam döngüsü; Doymuş dişi kene kenemip doyduktan sonra toprağa düşer ve yumurtlar. Daha sonra yumurtadan çıkan aç larvalar uygun konaktan kan emerek doyduktan sonra aynı konak üzerinde gömlek değiştirerek aç nimfler oluşur. Aç nimfler aynı konaktan kan emerek doyar ve konağı terk ederek uygun yerlerde (barınakların çatlak ve yarıklarının derin kısımlarında) kışı geçirirler. Havaların tekrar ısınmaya başladığı ilkbahar döneminde kışı geçirdikleri yerlerde gömlek değiştirip aç olgunları oluştururlar ve bunlarda kan emmek için uygun konağı aramaya başlarlar. Yeni konakta kan emme esnasında erkek keneler dişilerle çiftleşirler. Dişi kene erkeğe nazaran daha uzun süre konak üzerinde kan emer (yaklaşık bir hafta). Çiftleşmiş dişi kene doyduktan sonra kan emmeyi bırakır ve yumurtlamak amacıyla toprağa düşer ve yaşam döngüsünü tamamlar.

## 1.7. Tropikal Theileriosis'in Tanısı ve Tedavisi

### 1.7.1. Klinik Tanı

Hastalığın endemik olarak görüldüğü bölgelerde tanı genellikle klinik ve makroskobik bulgular ile yaz aylarında hayvan üzerinde görülen kene varlığına dayanarak yapılmaktadır. Laboratuvar şartlarında en sık kullanılan yöntem ise giemsa ile boyalı ince yayma kan frotileri ile lenf ya da karaciğer biyopsilerinde mikroskopta parazit varlığının gösterilmesi esasına dayanır (Pipano 1994, Sergent 1945). Ancak bu yöntemle akut vakalar ile kronik vakaları ve taşıyıcı hayvanların ayırımını yapmak kolay değildir. Bu yöntemin avantajları arasında örnek alınımının kolay olması, taşıma ve saklamasının rahat olması, teşhis için tek bir mikroskobun yeterli olması sayılabilir. Bununla birlikte, hazırlanan frotiler iyi kalitede olmalı ve lenf yumrusundan hazırlanan biopsilerde makroşizontların normal azurofilik granüller gibi artefaktlar ile karıştırılmaması gereklidir (Lawrence ve ark 1994). Hastalığın erken döneminde hazırlanan kan frotilerinde piroplazmlar ile enfekte eritrositler çok az veya hiç görülmeyebilir, bu durum taşıyıcı konumdaki hayvanlarla rahatlıkla karışır. *T. annulata* enfeksiyonlarında, perifer kandan hazırlanan frotilerde şizontlara çok nadir olarak rastlanır. Piroplazmlarla enfekte eritrosit sayısı hastalığın ilerleyen dönemlerinde artar ve %90 seviyelerine ulaşabilir, ancak bu durum hastalığın asıl tablosuna karşılık gelmemektedir. Hastalıktan kurtulan hayvanlarda piroplazmlar uzun süre kanda kalır, ancak bu kalıcı piroplazmların direkt mikroskobik bakı ile tanısı her zaman mümkün olamamaktadır (Pipano ve ark 1974).

*Theileria* türlerinin eritrositler içindeki piroplazm formları morfolojik olarak yuvarlak, çomak, oval, haç, anaplasmod ve virgül şekillerinde bulunabilir (Mimoğlu ve ark 1969, Uilenberg 1981). *T. annulata* enfeksiyonunun coğrafik dağılımı göz önünde tutulduğunda, *T. buffeli* (Purnell 1978) ve özellikle Sudan'ın güney kesimlerinde *T. parva* (Lomuro 1992) gibi diğer *Theileria* türlerinin de eş zamanlı olarak görüldüğü bölgelerde bu türler ile kesişebilmektedir. Bu bölgelerde parazitin farklı formlarının yüzdesine bakılarak ayırım yapılabilmektedir. Örnek olarak, *T. parva*'nın piroplazm formları genelde küçük ve çomak şeklinde iken *T. annulata* piroplazmları baskın olarak orta boylu, yuvarlak ve oval formlarda görülür. *T. buffeli* de ise çomak şekilli, genelde uzun ve eritrosit içindeki yapılar ile çizgi ilişki halindeki piroplazm formları baskındır. Ancak, hastalık esnasında piroplazmların bu formları değişkenlik göstermekte ve etkenlerin ayırıcı tanısına olanak vermemektedir (Norval ve ark 1992, Uilenberg 1981).

### 1.7.2. Antikor veya Antijen Kullanılarak Yapılan Serolojik Tanı

Hastalığa yakalanan hayvanlarda *T. annulata*'ya karşı oluşan antikorların belirlenmesinde kullanılan en yaygın serolojik teknik indirekt floresans antikor (IFAT) testidir. IFA testinde piroplazmlar ya da hücre kültürlerindeki şizontlar kullanarak hazırlanan preparatlar antijen olarak kullanılır. IFA, *T. annulata*'nın prevalans çalışmaları ve aşılınmış hayvanlardaki antikor yanıtının belirlenmesinde yoğun olarak kullanılan bir testtir (Pipano ve ark 1974). Yapılan bir çalışmada, IFA testinin mikroskopik olarak kan frotilerinde piroplazmların tespitine oranla daha iyi bir yöntem olduğu gösterilmiştir (Darghouth ve ark 1996b). Bununla birlikte, IFA testinin bir takım eksi yönleri vardır. Subjektif olması ve *T. parva*, *T. annulata*, *T. mutans* ve *T. taurotragi* türleri arasında belli derecelerde çapraz reaksiyon görülmesi testin özgüllüğünü olumsuz etkilemektedir (Burrige ve ark 1974). Aynı zamanda, *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale* ve *A. centrale* gibi diğer piroplazmalar ile çapraz reaksiyon verebilmektedir (Burrige ve ark 1974, Kiltz ve ark 1986, Kocan ve ark 2000, Molad ve ark 2006). IFA testinden ayrı olarak, komplement fiksasyon ve hemagglütinasyon inhibisyon testleri de *Theileria*'ya karşı oluşan antikorların belirlenmesinde kullanılmış, ancak özgüllüklerinin düşük olmasından ötürü pek tercih edilmemişlerdir (Norval ve ark 1992).

Enzim bağımlı immunosorbent testi (ELISA), son yıllarda veteriner hekimlikte hastalıkların tanısı ve epidemiyolojik çalışmalarda giderek yaygın şekilde kullanım alanı bulmuştur (Voller ve ark 1976). ELISA, IFA testine nazaran daha duyarlı ve özgül oluşu, çok sayıda örneğin incelenebilmesi ve ucuz olması ile daha avantajlıdır (Kemeny ve Chantler, 1988). Tropikal theileriosis'e yakalanan hayvanlarda etkene karşı oluşan antikorların belirlenmesi amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda parazitin piroplazm ve makroşizont döneminlerine ait işlenmemiş (ham) antijenler ayrı olarak ya da bir arada kullanılmıştır (Beniwal ve ark 1997, Prasanth ve ark 1995, Reddy ve ark 1994, Sundar ve ark 1993, Kachani ve ark 1992b, Gray ve ark 1980). Ancak bu antijenler kullanılarak yapılan testler duyarlılık ve özgülük yönünden tam manası ile incelenmemiştir. Kachani ve ark. (1992) tarafından, ham piroplazm antijenleri kullanarak yapılan ELISA'nın, bağışık hayvanlardan alınan serum örnekleri ile hem şizontlardan hazırlanan antijenlere göre daha etkili olduğu hem de daha az özgül olamayan bağlanma gösterdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, ham antijenler kullanılarak yapılan ELISA ile elde edilen sonuçlar IFA testi ile elde edilenlere nazaran daha düşük duyarlılık ve özgülüğe sahiptir (Kachani ve ark 1992a, 1994, 1996).



Son yıllarda, parazitin omurgalı konaktaki farklı yaşam dönemlerine (sporozoit, şizont, meroziot/piroplasm) özgü antijenler belirlenmiş ve bunlar ELISA'da kullanılmıştır. Bu antijenler arasında, sporozoit yüzey antijeni; SPAG-1 (Hall ve ark 1992, Williamson 1989), meroziot rhoptri antijeni; Tamr-1 (Shiels ve ark 1994), 32 kilo dalton (kDa) meroziot ve piroplasm yüzey antijeni; Tams-1 (Shiels ve ark 1995), *T. annulata* yüzey antijeni; TaSP (Schnittger ve ark 2002), şizont yüzey antijeni; TaD (Schneider ve ark 2004), şizont proteini; TaSE (Schneider ve ark 2007), mitokondriyal HSP70; TamtHSP70 (Schnittger ve ark 2000) yer almaktadır. SPAG-1 rekombinant proteini kullanılarak yapılan indirekt ELISA (enzim işaretli immunaracılı test) testi sonucunda bu proteinin doğal şartlarda enfeksiyona yakalanan hayvanların belirlenmesinde re enfekte olmamış yada tekrarlı kene enfestasyonuna maruz kalmamış hayvanlarda bu antijene karşı oluşan antikor miktarının tanı için yeterli düzeyde olmadığı görülmüştür (Matita 1994, Williamson ve ark 1994). Tamr-1 (merozoit rhoptri antijeni) kullanılarak yapılan ELISA testi ile bu proteinin tanı için uygun olduğu belirtilmiştir (Matita 1994). Yapılan bir diğer çalışmada bu antijenin sporozoitler ile enfekte hayvanların belirleyebilmiş, ancak attenüye hücre kültür ile aşılanan hayvanlarda bu proteine karşı gelişen antikor yanıtın yeterli düzeyde olmadığı ve preimmun hayvanlardaki antikor düzeyine yakın yada çok az yüksek olarak seyrettiği belirtilmiştir (Ilhan ve ark 1998). Tams-1 rekombinant antijeni kullanılarak yapılan çalışmalarda enfekte hayvanlarda üç aydan önceki dönemlerde IFA testi daha güvenilir sonuç verdiği görülmüştür. TaD immunojenik bir protein olmasına karşın patojen olmayan ovine *Theileria* türleri ile çapraz reaksiyon vermektedir. TaSE immunojenik bir proteindir, ancak bu proteine karşı gelişen antikor titresi ve bunun tanı amacıyla kullanılmasına ilişkin sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır (Schneider ve ark 2004, 2007). Mitokondriyal HSP70; TamtHSP70 antijenine karşı gelişen bağışık yanıtın belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada bu proteine karşı oluşan antikor yanıtın çok düşük olduğu gözlemlenmiştir (Seitzer ve ark 2007).

Bu tekniklerin yanında, omurgalı konakta *T. annulata*'nın varlığını belirlemede kullanılan iki farklı yöntem daha vardır. İlki, omurgalı konakta enfekte lökositler içindeki makroşizontların belirlenmesinde kullanılan *in vitro* perifer kan mononükleer hücrelerinin izolasyonudur, bu yöntemle *Theileria* makroşizontları ile enfekte hücrelere doku kültüründe *in vitro* ortamda çoğalma şansı vererek üremelerini sağlayıp enfeksiyonun belirlenmesidir (Kariuki ve ark 1995, Stagg ve ark 1974, Sharma ve Brown 1981). İkincisi ise taşıyıcı hayvanların belirlenmesinde kullanılan ksenodiagnoz (xenodiagnoz)'dur, bu yöntemde enfeksiyonu taşıdığı düşünülen hayvanların üzerinde beslenen keneler doyup düştükten sonra gömlek değiştirerek muhtemel enfeksiyona ait sporozoitleri tükürük bezlerinde bulundurlar

ve bu keneler duyarlı hayvanda beslenerek enfeksiyonun yeni hayvana nakledilip edilmediğine bakılarak uygulanan bir yöntemdir (Dolan 1986, Sergent 1945). Tarif edilen bu son iki yöntem uzun ve zahmetli olduğu için rutin uygulamalarda sıkça başvurulan bir yöntem değildir.

### 1.7.3. Moleküler Tanı

Son yıllarda, moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler enfeksiyona yol açan etkenlerin moleküler düzeyde belirlenmesine olanak sağlamıştır. Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde, parazite özgü DNA bölgeleri plazmid vektörlere klonlanarak enfekte hayvanlarda *Theileria* DNA'sının varlığı duyarlı ve özgül olarak belirlenebilmektedir (Allsopp ve ark 1993, Conrad ve ark 1987). Özgül DNA problemleri, hastalığın prepatent, patent ve iyileşme dönemi ile taşıyıcı konumundaki hayvanlarda hastalığa yol açan etkene özgü DNA bölgelerini belirlemektedir (Figueroa ve Buening 1995). Daha önceleri, parazite ait piroplazm ve şizont dönemlerinin morfolojik farklarına göre ayırımları yapılamayan türlerde bu yöntemler sayesinde, parazit türü ile o türe ait farklı suşların ayırımı mümkün kılınmıştır (Norval ve ark 1992). Afrika'nın doğusu ve merkezinde görülen *T. parva* enfeksiyonlarının belirlenmesi için birçok çalışma yapılmıştır. Restriksiyon enzimleri ile kesilen *T. parva*'nın klonlanmış lenfoblastoid hücre kültürü ve farklı bölgelerden izole edilen suşlarında DNA problemleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, *T. parva*'nın antijenik olarak farklı alt klonlarında ve farklı bölgelerden izole edilen suşlarında belirgin bir farklılık görülmüştür (Bishop ve ark 1994, Conrad ve ark 1987). *T. annulata*'nın populasyon genetiği çalışmasında restriksiyon enzimi ile kesilen bölgelerinin boy farklılıklarının (RFLP; restriction fragment length polymorphism) belirlenmesinde de DNA problemlerinden faydalanılmıştır (Ben Miled ve ark 1994). Son yıllarda yapılan populasyon genetiği çalışmalarında ise RFLP yönteminden daha ziyade genom üzerinde bulunan peşpeşe sıralı tekrarlı nükleotid bölgeler (tandem bölgeler) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılarak örnekler arasındaki farklı populasyonlar daha etkili analiz yöntemleri ile belirlenilmektedir (Weir ve ark 2007).

Hızlı ve türe özgü tanı sistemi geliştirilmesi için yapılan çalışmada, ribozomal RNA'nın küçük alt ünitesinin (ssurRNA) her bir parazit türüne özgü bölgelerine ait oligonükleotid problemler tasarlanmış (Allsopp ve ark 1993) ve bu problemler kullanılarak altı farklı parazit türü hem direkt olarak hem de PZR ile çoğaltılmış parazit ssu rRNA genine hibridizasyonu ile tespit edilmiştir. Bu gen bölgesine özgü oligonükleotid problemler PZR için çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (de Kok ve ark 1993, İlhan ve ark 1998). Polimeraz zincir reaksiyonunun sunduğu avantajlardan biride hem omurgalı hem de

omurgasız konaklardan alınan DNA örneklerinde parazite ait çok küçük miktarlardaki DNA'yı kolayca ve özgül olarak çoğaltabilmesidir. Son yıllarda, *T. annulata*'nın teşhisinde bir çok farklı PZR metodu kullanılarak hem vektör kenelerde (d'Oliveira ve ark 1997b, de Kok ve ark 1993) hem de omurgalı konakta (d'Oliveira ve ark 1995, Ilhan ve ark 1998, Shayan ve ark 1998, Gubbels ve ark 1999, Leemans ve ark 1999b, Martin-Sanchez ve ark 1999) parazitin teşhisi yapılmıştır. PZR tekniğinde kullanılan primerler 18S ssu rRNA genini (de Kok ve ark 1993, Georges ve ark 2001, Gubbels ve ark 1999, Ilhan ve ark 1998), *T.annulata* major yüzey proteini (Tams-1) genini (d'Oliveira ve ark 1995, Kirvar ve ark 2000, Martin-Sanchez ve ark 1999), ısı şok protein 70 (HSP70; heat shock protein 70) genini (Shayan ve ark 1998), beta tubulin ( $\beta$ -tubulin) genini (Caccio ve ark 2000) ve mitokondriyal sitokrom genini (Criado ve ark 2006) çoğaltarak parazitin teşhisine olanak sağlamıştır. Yukarıda belirtilen genlerin PZR tekniği ile çoğaltılarak etkenin teşhisine olanak sağlamanın en önemli avantajlarından biri daha önceleri kullanılan mikroskopik yöntemlere nazaran daha duyarlı ve özgül olmasıdır. Yapılan çalışmalarda, N516/N517 primerler çifti kullanarak PZR ile çoğaltılan Tams1 geninin duyarlılığının 2 – 3 parazit /  $\mu$ l kan (d'Oliveira ve ark 1995), Tams1-T3/Tams1-T5 ve Tams1F/Tspms1R primerleri kullanarak nested PZR ile çoğaltılan Tams1 geninin duyarlılığının 1 parazit /  $\mu$ l kan (Kirvar ve ark 2000), 989-1347 primerler çiftleri kullanarak PCR ile çoğaltılan ssu rRNA geninin duyarlılığının 1 parazit / 4  $\mu$ l kan (Ilhan ve ark 1998) olduğu bulunmuştur. Son yıllarda geliştirilen RLB (reverse line blot) hibridizasyon tekniği birçok *Theileria* ve *Babesia* türünün eş zamanlı teşhisine olanak sağlamıştır (Gubbels ve ark 1999). Bu yöntemde *Theileria* ve *Babesia* türlerinin 18S ssu rRNA geninde ortak olarak bulunan bölgelere özgül olarak bağlanan primerler kullanarak bu türler arasında farklılık gösteren V4 bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltılıp, daha sonraki basamakta çoğaltılan örnekler her parazit türüne ait 18S ssu rRNA genindeki özgül V4 değişken bölgesine bağlanan oligonükleotid problemlerin bağlandığı membran üzerine konularak tür ayrımı yapılmaktadır. Yapılan çalışmada, RLB-F/RLB-R primerleri kullanarak çoğaltılan ve RLB hibridizasyonu ile belirlenen 18S ssu rRNA geninin duyarlılığının *T. annulata* için 3 parazit /  $\mu$ l kan (Gubbels ve ark 1999) olduğu belirlenmiştir. Bu yöntem ile sığırlarda görülen yedi *Theileria* (*T. annulata*, *T. parva*, *T. mutans*, *T. taurotragi*, *T. velifera*, *T. buffeli* / *orientalis* grup ve *T. orientalis*) ve üç *Babesia* (*B. bovis*, *B. divergens* ve *B. bigemina*) türünün teşhisi yapılabilmektedir.

#### 1.7.4. Tedavi

Tropikal theileriosis ve ECF'ye yakalanan hayvanların tedavisinde kullanılan en etkili ilaç buparvaquone'dur (McHardy ve ark 1985, Singh ve ark 1993). Yapılan deneysel enfekte sığırlarda, 5 mg/kg veya 2.5 mg/kg dozlarda intramuskuler tek dozluk enjeksiyonun hastalığa yol açan şizont ve piroplazmaları elimine ettiği gösterilmiştir (Singh ve ark 1993). Bununla birlikte, hastalığın geç dönemlerinde ve 2.5 mg/kg dozlarında kullanımını takiben hayvanlarda ikinci bir doz daha uygulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır (McHardy ve ark 1985, Mishra ve ark 1993).

### 1.8. Tropikal Theileriosis de Korunma ve Kontrol Yöntemleri

#### 1.8.1. Direçli Irkların Kullanılması

Kenelerle bulaşan hastalıkların kontrolünde geçerli olan metotlardan biride dirençli ırkların geliştirilmesidir, bu amaçla Hindistan'da uygulanan programda ithal hayvanların sayısı azaltarak tropikal theileriosis' in prevalansı düşürülmüştür (Glass ve ark 2005). Uzun vadede, hem theileriosis hem de vektör kene enfestasyonuna dirençli ırkların kullanılması hastalığın kontrolünde önemli olmaktadır (Brown 1990). Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda, Avrupa ülkelerinden ithal edilen sığır ırklarının yerli ırklara oranla tropikal theileriosis'e karşı daha duyarlı oldukları görülmüştür (Darghouth ve ark 1999, Hashemi-Fesharki 1988). *Bos taurus* ve *Bos indicus* / *Bos taurus* melezi (Sawihal) sığırlarda *T.annulata* sporozoitlerinin farklı dozları kullanılarak oluşturulan deneysel enfeksiyonda, gelişen klinik belirtilerin *Bos taurus* ırkı buzağılara nazaran melez ırkta doza bağlı olduğu ve bununda Sawihal melezlerindeki ırk direncine bağlı olabileceği düşülmüştür (Preston ve ark 1992). Bir başka çalışmada, saf kan Sawihal ırkı buzağılarda, holştayn ırkı buzağılara oranla hastalığın daha az öldürücü olduğu gösterilmiştir (Glass ve ark 2005). Sudan'da yapılan bir diğer deneysel çalışmada, *T. annulata*'nın letal dozları ile enfekte edilen yerli Kenana ırkı ve Friesian ırkı sığırlardan, Friesian ırkı sığırların tümünde görülen mortaliteye karşın Kenana ırkı sığırın sadece iki adedi tedaviye ihtiyaç duymuştur. Bununda Kenana ırkı sığırlarda enfeksiyon esnasında görülen düşük şizont parazitozu ve azalmış lökopeni ile ilişkili olarak meydana gelen düşük lenfoid doku hasarıyla ilgili olduğu söylenmiştir (Bakheit ve Latif 2002). Dirençli ırkların seçimi ve bunların yetiştirilmesinde karşılaşılan en önemli problem hem direçli hem de yüksek verime sahip olan hayvanların seleksiyonu ve yetiştirilmesinin zorluğudur. Bu bakımdan dirence sebep olan genler belirlenebilir ve bu gen bölgeleri yüksek verimli ırklara aktarılabilirse (Spooner ve Brown, 1991) hastalığa bağlı gelişen ekonomik

problemler ortadan kalkabilecektir. Hastalıkla mücadelede bir diğerk önemli noktada hastalığın naklinde rol oynayan vektör kenelerdir. Kene enfestasyonlarına daha dirençli ırkların kullanılması tropikal theileriosis' in dolaylı yolla kontrolünde önem taşımaktadır. *Bos indicus* melezi sığırların *Bos taurus* ırkı sığırlara nazaran %10 ila %40 oranında daha az kene taşıdıkları belirtilmiştir (Campbell, 1978). Burundi'de yüksek verimli kültür ırkı sığırlar ile yerli Ankole sığır ırkı arasında yapılan çaprazlamalar sonucu üretilen melez ırkların kene (özellikle *Rhipicephalus appendiculatus* kenesi) enfestasyonlarına karşı dirençlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, Ankole/Sahiwal melezlerinin kayda değer oranda dirençli oldukları gösterilmiştir (Moran ve ark 1996).

### **1.8.2. Vektör Mücadelesi**

Endemik bölgelerde, çiftlik yönetimi ve vektör kene mücadelesi theileriosis'in etkilerini azaltmada geleneksel olarak uygulanan etkili yöntemlerdir. Hastalığın naklinin önlenmesinde belirlenen ana hedef, vektör kene ile duyarlı hayvanın temasını önleme yoluyla hastalığın omurgalı konağa naklinin engellenmesi ya da endemik stabilitenin oluşması için hayvanları hastalığa en dirençli oldukları dönemde kasten enfeksiyona yakalanmaları için kene enfestasyonuna maruz bırakılmasıdır (Brown 1990). Kene enfestasyonlarının kontrolü sığırların ve bunların bulunduğu barınakların akarazit ile muamelesi yoluyla yapılmaktadır. Bununla birlikte hayvan barınaklarında vektör kenelerin kışı geçirmek için saklanabilecekleri yarık ve çatlakların kapatılması ya da akarazitler ile muamelesi de önemlidir. Kene mücadelesinde akarazitler banyo, spray, dökme, damlatma, serpmeye, hap ya da enjeksiyon tarzında kullanılmaktadır. Akarasitlerin kenelerle bulaşan hastalıkların kontrolü için kullanılmasında karşılaşılan birçok problem vardır; (i) banyo yönteminde tüm hayvanların uygun şekilde akarazite maruz kaldığından emin olunmalıdır, (ii) uzun süreli aynı akarazitin kullanımı kenelerde direnç gelişmesine yol açabilmektedir, (iii) devamlı akarazit kullanımı bölgede endemik instabilite gelişmesine ve akarazit kullanımında meydana gelebilecek herhangi bir aksaklığa bağlı hayvanları tekrar kene enfestasyonuna maruz kalması ile salgın riski oluşabilmektedir (Tait ve Hall 1990). Akarazit kullanımının bir başka dezavantajı da artan maliyetleri, hayvansal ürünlerde ve çevrede kalıntı bırakmalarındadır (Norval ve ark 1992).

### 1.8.3. Kemoterapi

Tropikal theileriosis'e karşı aşı kullanımının tam olarak yaygın olamadığı bölgelerde hastalık akarazitler ve kemoterapi yoluyla yapılmaktadır. Daha önceleri yapılan çalışmalarda, antibakteriyel ve antiprotozoal etkiye sahip birçok ilaç bildirilmiş, ancak bunlardan hiçbirinin antitheilerial etkiye sahip olmadığı görülmüştür (Neitz 1957). Bunlardan biri olan tetrasiklin gurubu antibiyotiklerin klinik bulgular üzerinde az da olsa etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Hashemi-Fesharki ve Shad-Del 1974). Daha sonraki dönemlerde, theileriosis'e karşı etkili ilaçlar geliştirilmiştir. Bunlardan ilki antimalaryal bir ilaç olan naphtoquinone türevi menoctone'dur (McHardy ve ark 1976), bu ilaç hastalığa karşı etkili olmasına karşın oldukça pahalıdır. Bir diğeri ise, *T. annulata* enfeksiyonlarına karşı oldukça etkili olan halofuginone'dur (Schein ve Voigt, 1979), ancak bu ilacın toksik dozu terapötik dozuna çok yakındır. Daha sonra, naphtoquinone' un farklı bir türevi olan parvaquone'un *T. annulata*'ya karşı etkili olduğu bulunmuştur (Gill ve ark 1984). Parvaquone'u takiben geliştirilen buparvaquone ona nazaran çok daha etkili bir ilaç olmuştur (McHardy ve ark 1985). Buparvaquone'un, *T. annulata*'ya karşı gösterdiği yüksek etkisi ve güvenilirliği sayesinde şu anda dünyada antitheilerial olarak kullanılan en yaygın ilaçtır. Şu anda ticari olarak farklı firmalar tarafından çeşitli isimler adı altında buparvaquone etken maddeli birçok ilaç bulunmaktadır (Butalex, Theilerol, Parvakuvil, Buparvon vb.). İlacın son yıllarda giderek artan yaygın kullanımı beraberinde birçok soruna da yol açmıştır. Bunların başında hastalığın endemik olarak görüldüğü Türkiye ve Tunus gibi ülkelerde ilaçla yapılan tedavilere tam bir yanıt alınamaması bulunmaktadır. Bu da parazitin ilaca karşı geliştirdiği muhtemel dirence bağlı olabilmektedir (T. Karagenç, M. Darghouth, kişisel bilgi).

### 1.8.4. Aşılama

#### 1.8.4.1. Kan Transfüzyonu ile Aşılama

Sığırlarda tropikal theileriosis'e karşı kan transfüzyonu yoluyla aşılama denemeleri 1920 ila 30'lu yıllarda Cezayir'de *T. annulata*'nın düşük virülense sahip saha izolatları ile enfekte hayvanlardan alınan kanın enfekte olmayan hayvanlara verilmesi yoluyla yapılmıştır. Düşük virülense sahip suş ile enfekte edilen hayvandan alınan kan sığırdan sığıra mekanik olarak nakledilerek parazitin merozoit formuna dönüşebilme yeteneği kaybolmuş ve bu kanlar transfüzyon yoluyla enfekte olmayan hayvanlara verilerek korumada kullanılmıştır. Bu çalışmalarda, virülent olmayan bir suş bulmak amacıyla birçok izolat denenmiş ve son olarak Kouba izolatının piroplasm oluşturma yeteneğini kaybettiği görülmüştür. Yapılan pasajlamalar esnasında kullanılan hayvanlarda suşa bağlı olarak %3,2 oranında mortalite

görülmüştür (Sergent 1945). İsrail’de düşük virülense sahip Cezayir suşları (Kuoba ve Brunette) kullanılarak yapılan aşılamalarda hayvanlarda bölgesel suşlara karşı gelişen korumanın zayıf olduğu görülmüş ve bu sorunu aşmak için iki aşamalı bir aşılama protokolü uygulanmıştır. İlk olarak, hayvanlar düşük virülense sahip yabancı (o bölgeye ait olmayan) bir suşla inokule edilmiş ve bunu takip eden ikinci ayda ilk aşılama oluşun kısmi korumayı arttırmak için hayvanlar virülensi yüksek bölgesel bir suş ile tekrar inokule edilmişlerdir (Adler ve Ellenbogen 1934). Yine 1940’lı yıllarda İsrail’de buna benzer bir çalışmada, düşük virülense sahip Tunus izolatu ile enfekte edilen hayvanlar iki ay sonra bölgesel bir izolat ile tekrar enfekte edilerek izolatlar arasındaki muhtemel farklılıklar ve farklı izolatların sağladığı bağışıklığa bakılmıştır (Pipano 2006). Bu tür aşuların alıcı hayvanlara tropikal theileriosis ve kan yoluyla bulaşan diğer hastalıkların nakledilmesi yönünden büyük risk taşımaktadır. Avustralya’da Bovine Löykoz virusuna karşı yapılan tarama sonucu, babesiosis ve anaplasmosis’e karşı kullanılan aşuların bir kısmında kontaminasyon oluştuğu belirlenmiştir (Rogers ve ark 1988).

#### **1.8.4.2. Enfeksiyon ve Tedavi Yöntemi**

Enfeksiyon ve eş zamanlı olarak yapılan tetrasiklin uygulamasının *T. annulata*’ya karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Enfekte edilen ve klortetrasiklin’in farklı dozları kullanılarak yapılan çalışmada , hayvanlarda orta şiddette bir enfeksiyona rastlanmış ve bu hayvanlarda öldürücü homolog suşlara karşı kalıcı direnç gelişmiştir (Gill ve ark 1976). *T.annulata*’nın sporozoitleri kullanılarak enfekte edilen ve bunun takiben buparvaquone ile tedavi edilen hayvanlarda enfeksiyonun gelişmesi engellenmiş ve bu hayvanların tamamen ya da kısmi olarak duyarlı halde kaldıkları görülmüştür (Ngumi ve ark 1992). Etkinliğinin iyi olmasına karşın, bu yöntemin pahalı oluşu ve soğuk zincir gerektirmesi sebebiyle yaygın kullanım alanı bulamamıştır. Bunun yanında bu yöntem o bölgede bulunan tüm *T. annulata* suşlarına karşı koruma sağlayamamakta ve o bölgeye aşılama yoluyla yeni bir parazit varlığının aktarılması söz konusu olmaktadır.

### 1.8.4.3. Hücre Kültürü Aşıları

Hücre kültürü aşıları, tüm dünyada endemik bölgelerde kullanılan ve makroşizontların hayvana inokule edildikten sonra konak mononükleer hücrelerine girerek yerleşme özelliğinden faydalanılarak geliştirilmiş bir yöntemdir. Kan transfüzyonu ile aşılama kullanılan yöntem benzer şekilde şizontlar ile enfekte hücre kültürler *in vitro* ortamda pasajlanarak virülensi attenüye edilmektedir (Darghouth ve ark 1996a, Pipano ve Shkap 2000).

Şizont hücre kültürü aşılarının üretimi ve kullanımı bir çok araştırmacı tarafından tanımlanmıştır (Pipano 1997, Norval ve ark 1992, Boulter ve Hall 1999). Tsur ve Pipano (1966) *T. annulata*'yı *in vitro* olarak başarılı şekilde kültüre etmişler ve tropikal theileriosis'e karşı hücre kültürü aşılarının kullanımına olanak sağlamışlardır. *T. annulata* ile enfekte hücrelerin uzun süre kültüre edilmesi parazit virülensinde azalmaya yol açmaktadır (Tsur ve Pipano 1966). Tam attenüasyon ise kültüre edilen şizontların hayvanlarda parazitemi veya klinik ve parazitolojik belirtilerinin görülmemesi ile şekillenmektedir (Pipano 1977). Buna rağmen, makroşizontlara karşı IFAT ile ölçülen antikor yanıt virulent şizontlarla oluşan enfeksiyonlardaki seviyeler ile benzerlik göstermektedir (Pipano 1997). Parazitin ilk virülensi ile attenüasyonu için gerekli olan sürenin belirlenmesini sağlayan her hangi bir belirteç bulunmamaktadır. Bununla beraber farklı izolatlar arasında tam bir attenüasyon için gerekli olan zaman değişiklik göstermektedir (Hooshmand-Rad 1973, Pipano 1997). Attenüasyon ile populasyonda bulunan genotip sayısında seleksiyona bağlı oluşan azalma arasında bir ilişki olduğu, homolog suşlarla oluşturulan re enfeksiyonlara karşı optimal koruma sağlarken (Darghouth ve ark 1996a, Gill ve ark 1980), heterolog suşlara karşıda iyi bir direnç geliştirdiği bildirilmiştir (Darghouth ve ark 1996a, Hashemi-Fesharki 1991). Duyarlı konumdaki yerli ve egzotik hayvanlarda etkili koruma sağlamaktadır. Virulent *T. annulata* suşlarına özgü antikor kulanılarak yapılan çalışmada *in vitro* koşullarda antikor duyarlılığında farklılaşmalar görülmüş, antikor tarafından belirlenen antijenin parazit dönemine özgü olduğu ve aynı zamanda bu antijenin virulent suşlarda hücre yüzeyinde sentezlendiği ve attenüasyonla birlikte azaldığı belirlenmiştir (Sutherland ve ark 1996, Preston ve ark 1998). Aynı zamanda, attenüasyonun belli seviyelerde enfekte hücrelerin T hücre uyarım yetenekleri ve ürettikleri sitokin düzeyleri ile ilişkili olduğu, bu iki faktörü yüksek düzeyde üretilen hücrelere nazaran daha düşük seviyelerde üreten klonal hücrelerin hastalığın şiddetini de daha az indüklediği görülmüştür (Brown 1997, Brown ve ark 1998).



Re enfeksiyonun olmadığı durumlarda, aşılama takiben bağışıklık bir (Pipano 1977) ile üç buçuk yıl (Zablotskii 1991) arasında kalıcılığını sürdürebildiği bildirilmiş olsa da bazı hayvanlarda aşılama sonrasındaki dönemlerde klinik theileriosis görülebilmekte (Pipano ve Shkap 2006) ve yine kullanılan doza bağlı olarak kimi aşılama sonrasında yedi ay gibi bir dönem sonunda koruma olmamaktadır (Ouhelli ve ark 1994). Bu da doğal yolla oluşan re enfeksiyonların yetersiz olduğu bölgelerde hayvanların tekrar aşılama ihtiyacı duyacağını göstermektedir. Bununla beraber, aynı hücre kültürü aşısının kullanılmasına bağlı olarak ilk inokule edilen donör lökosit hücrelerine karşı hayvanda gelişen allojenik yanıtta oluşan dolaşımdaki antikorlar parazitin alıcı hayvana transferini bloke edebilmektedir. Yine de, farklı konak MHC feotipine sahip ikinci bir aşılamanın yapılması bağışıklığı güçlendirmektedir (Pipano ve Shkap 2006). Aşılama öncesinde, alıcı hayvanın ve donör hücrelerin sığır lökosit antijen (BoLA) yapısının belirlenmesinin gerekli olmadığı ve *T. annulata* parazitlerinin hücre kültürü aşılardan konağa aktarılmasının doku uyumundan bağımsız olduğu gösterilmiştir (Innes ve ark 1989). Bu durum, *T. parva*'da gözlenen ve parazitin konağa aktarılmasında donör ile alıcıya ait MHC sınıf I genotiplerinin benzer olması gerekliliği ile tam bir zıtlık oluşturmaktadır (Dolan ve ark 1984).

*Theileria parva* ile enfekte hücre kültürlerinin *in vitro* attenüasyonuna immunojenitenin kaybolması eşlik etmektedir (Brown 1981), bu farklılıklara bağlı olarak ECF'nin kontrolünde enfeksiyon ve tedavi yöntemi, tropikal theileriosis için hücre kültürü aşılı kullanılmaktadır. Virüsent hücre kültürlerinin erken dönem pasajları esnasında gen ekspresyonundaki değişimlere bağlı olarak seleksiyon olduğu öne sürülmüştür (Sutherland ve ark 1996) bununla birlikte attenüasyondaki moleküler etkileşimler tam olarak belirlenmemiştir. Enfekte hücrelerde görülen matriks metalloproteinaz aktivitesinin attenüasyona bağlı olarak kaybedilmesinin metastaz, abomasal ulser oluşumu ve kaşeksi gibi klinik belirtilerin görülmemesine etkisinin olabileceği öne sürülmektedir (Adamson ve ark 2000, Adamson ve Hall 1997, 1996). Aynı zamanda konak hücre çekirdeğine taşınan parazite ait proteinlerinde attenüasyonda gen ekspresyon profilini etkileyebileceği ve parazit tarafından kodlanan konak çekirdek proteini TashHN'in attenüye hücrelerde daha fazla sentezlendiği belirlenmiştir (Swan ve ark 2003), bununla birlikte bu proteinin virülens üzerine etkisinin nasıl olduğu tam olarak açık değildir. Türkiye kökenli hücre kültürü üzerinde yapılan bir çalışma da parazitin merozoit formuna farklılaşmasında azalma olduğu ve attenüye ile attenüye edilmemiş hücreler arasında mRNA seviyesinde farklı gen ekspresyon profili belirlemiştir. Bununla birlikte, yüksek oranda piroplasm üretmeyen ancak virülensi yüksek olan saha izolatlarının attenüasyonda yalnız başına bu olgunun yeterli olamayacağını

göstermektedir (Somerville ve ark 1998b). Hücre kültürü aşılarının piroplasm ve taşıyıcı hayvanların oluşumundan koruyamadığı bilinmektedir (Zablotskii 1991). Bu tür piroplasm lar beslenen kenelerce oluşturulan süper enfeksiyonlar ile ya da inokule edilen aşıda bulunan kimi az sayıdaki makroşizontun farklılaşması yoluyla oluşmuşabilmektedir.

Hücre kültürü aşılarının üretiminin nispeten ucuz olmasına rağmen, üretilmelerinin oldukça zahmetli olması, soğuk zincir gerektirmeleri, aşının doğru şekilde uygulanmasında deneyime ihtiyaç duyulması gerekmektedir. Aşıların çözdürülme takiben +4°C’da bir ila iki ay kadar zarar görmeden tutulup kullanılabilmesi (Zhang 1991) soğuk zincir gereksinimini bir aşamaya kadar kolaylaştırmaktadır. Hücre kültürü aşılarında görülen bir diğer dezavantajda aşılama sonrası laktasyondaki veya gebe olan hayvanlarda geçici ateş oluşturabilme riskidir (Hashemi-Fesharki 1988). Aşılamayı takiben sekiz ila 11. günlerde eritrositlerin %1’inden azında piroplasmaların görülebilmesi ve ortalama 40°C’a varan ateş ile aşılama bölgesine en yakın lenf yumrusunda oluşan şizontlar (%1–2) görülen en belirgin klinik bulgular arasındadır (Darghouth 2008, Seitzer ve Ahmed 2008). Bu bulgulara bakarak attenüye hücre kültürü aşılama, her ne kadar hastalığın endemik olarak görüldüğü bölgelerde kontrol amaçlı kullanılan başlıca yöntem olsa da, aşılama hayvanlarda gözlenen geçici ateş yükselmesi ve az da olsa piroplasmalara rastlanması aşılamanın hayvanları taşıyıcı hale getirerek enfeksiyonun devamına olanak sağlayabilmektedir. Bu durum endemik instabil bölgeler açısından önem taşımaktadır. Kandan izole edilerek elde edilen aşılar her ne kadar duyarlı hayvanlarda denenmiş olsa da ileriki dönemlerde bunların tekrar virülens hale dönüşme riskleri tamamen ortadan kalkmamaktadır (Pipano 1997). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda aşılama hayvanlar da gelişen bağışık yanıtta enfekte hücre yüzeyinde MHC sınıf I molekülleri tarafından sunulan parazit aracılı peptidlerin CTL tarafından tanındığı bunların *T. annulata*’ya karşı koruyucu hücre aracılı bağışıklığın oluşmasında gerekli peptidler olduğu belirlenmiş ve parazite özgü, MHC–I aracılı CTL yanıtın sadece hastalığa bağışık hayvanlarda belirlenip, hasta yada duyarlı olanlarda görülmediği vurgulanmıştır (Seitzer ve Ahmed 2008). Buna ek olarak, aşı hayvanlarda gelişen korumanın heterolog suşlara karşı zayıf olmasında farklı suşlara özgü oluşan CTL yanıtın rolünün olabileceği belirtilmiştir (Darghouth 2008) ve son yapılan çalışmada aşılama hayvanlar da oluşan CD8 T hücre yanıtın parazit suşlarına özgü olduğu, bununla birlikte bağışık yanıt oluşan populasyon içinde ve klonlanmamış parazit populasyonundaki hedef antijenlerde, suşlara özgü CD8 T hücrelerinin heterojenite gösterdiği belirlenmiştir (Machugh ND ve ark, 2008). Hücre kültürü aşılarının koruyuculuğun da enfekte hücre yüzeyinde sunulan parazit suşlarına ait farklı peptidlerin oluşu ve CTL yanıtta gözlenen farklılıklar bize tropikal

theileriosis'e karşı korumada CTL hücreleri tarafından tanınan bu peptidlerin belirlenerek bunlara yönelik sub unit aşilar geliştirilmesinin önemini göstermektedir. Bu sebeple her ne kadar attenüye hücre kültürü aşilarının başarılı olarak kullanılıyor olmalarına karşın etkili sub unit aşiların geliştirilmesi ile bu kısıtlayıcı etkiler ortadan kaldırılabilir.

#### **1.8.4.4. Sub – unit Aşilar**

Atenüye hücre kültürleri kullanılarak yapılan aşilamalarda elde edilen başarılı sonuçlara rağmen, bu aşiların kullanılmasında bir takım önemli sakıncalar bulunmaktadır. Bunlar arasında, 20°C'da bir hafta ve 4°C'da iki ay (Zhang 1991) olan bozulmadan kalma süreleri, nakledilirken soğuk zincire ihtiyaç olması, laktasyondaki ve gebe hayvanlarda aşilamaya bağlı oluşabilen geçici ateş (Hashemi-Fesharki 1988), hücre kültürleri ile oluşan bağışıklığın piroplazmaların oluşmamasını tam olarak engelleyememesi ve hayvanların taşıyıcı olması (Zablotskii 1991), aşilanan hayvanlara diğer patojenlerin bulaşabilme riski sayılabilmektedir. Ayrıca, atenüye hücre kültürü aşilarının hazırlanması zahmetli ve özen gerektirmektedir. Sayılan bu sakıncaların önlenmesi için alternatif yol olan subunit aşilar kullanılabilir. Bu tür aşilamalarda kullanılacak koruyucu antijenleri kodlayan genlerin belirlenebilmesi için yapılan çalışmalar halen devam etmektedir. *T. annulata*'nın sporozoitlerine karşı kullanılacak aşilar sayesinde parazitin enfektif dozunda yani hücreleri enfekte eden parazit sayısında azalmaya bağlı klinik bulguların azalması sağlanabilir, bunun yanında mononükleer hücrelerin çoğalmasının ve patolojik etkilerinin kontrolü için makroşizont dönemine spesifik antijenler kullanılarak subunit aşilar geliştirilebilir ve son olarak eritrosit enfeksiyonunun azalması ve hastalığın vektör kenelere naklinin engellenmesi için merozoit/piroplazm dönemine karşı geliştirilen subunit aşilar kullanılabilir (Weir 2006). Bu güne kadar kullanılan antijenlere aşağı başlıklar halinde değinilmiştir.

- **Sporozoit Antijenleri**

Enfekte kenelerle tekrarlanan enfestasyona maruz kalan hayvanlarda sporozoitlere karşı humoral bağışıklık oluştuğu bilinmektedir (Williamson 1988). İnaktive edilmiş sporozoitler kullanılarak yapılan deneysel çalışmada, hayvanlar tekrar enfeksiyona maruz bırakıldıklarında makroşizont gelişiminde yavaşlama görülmüştür. Bununla birlikte, doğal ortamda sporozoitlere karşı gelişen bağışıklığın hayvanları tropikal theileriosis'e karşı tam olarak korumasının beklenemeyeceği ileri sürülmüştür (Williamson ve ark 1989). *T.parva* sporozoitlerinin dolaşımında on dakikadan az süreyle kaldığı belirtilmiştir (Fawcett ve ark

1982a,b). Bu durum, bağışlık sistemine ait elemanların sporozoitleri belirleyerek etkisizleştirebilmesi için kısa bir süre olmasına karşın, efektif dozun azalmasına ve buna bağılı olarak parazitin diğer safhalarına karşı koruyucu bağışıklığın gelişmesine olanak sağlayabilir (Weir 2006).

*Theileria annulata* sporozoitlerine karşı gelişen humoral bağışıklıktan sorumlu antijeni kodlayan gen bölgesi 1989 yılında belirlenerek, SPAG-1 olarak isimlendirilmiştir (Williamson ve ark 1989). Yapılan IFA testleri ile sporozoitlere özel monoklonal antikoları (mAb) üreten hibridoma hücreleri belirlenmiş ve bu monoklonal antikolar kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmada sporozoitlerin mononükleer hücreleri enfekte etme becerilerinin monoklonal antikolardan biri olan mAb 1A7 tarafından büyük ölçüde bloke edildiği gözlenmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda, SPAG-1'in 907 amino asitten oluşun 91,6 kilo dalton (kDa) moleküler ağırlıkta bir protein olduğu belirlenmiştir (Hall ve ark 1992). Proteinde PGVGV ve VGVAPG peptit motiflerinden oluşun tekrarlı bölgelerin genin N-terminal kısmında bulunduğu ve bu motiflerin sığır elastinlerinde bulunan tekrarlı bölgeler ile amino asit düzeyinde yüksek benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Proteinin N-terminalindeki signal peptidler bu proteinin parazit tarafından üretildikten sonra dış ortama gittiğini göstermekte ve bu yapı çoğu hidrofobik olan 18 amino asitten oluşmaktadır. C – terminalde bulunan 24 amino asitlik hibrofobik alanın membran bağlanma bölgesi olduğu düşünülmektedir. SPAG-1 ile sığır elastini arasındaki tekrarlı alanların benzerliği iki şekilde açıklanmıştır. Bunların ilkinde, parazitin konak proteinleri ile benzerlik gösteren alanları kullanarak bağışık yanıtta korunduğudur. Ancak bu durumda, SPAG-1 proteini kullanılarak yapılan aşılamalarda konakta ya oto immun hastalık tablosu ya da proteine karşı bağışık yanıt geliştirmeme görülmelidir. Elastin reseptörlerinin VGVAPG elastin peptidlerine bağlanarak, *T. annulata* sporozoitlerinin tercihen invaze oldukları monositik hücrelerin pozitif kemotaksisinde rol oynadığı bilinmektedir (Blood ve ark 1988, Mecham ve ark 1989, Robert ve ark 1989). Buna bağılı olarak yapılan ikinci muhtemel açıklamada, parazitin proteindeki benzer alanları konak hücreleri belirlemede bağlayıcı olarak kullandığını farz etmektedirler. Daha sonraları, sporozoit yüzey antijeninin tek bir gen tarafından kodlandığı, farklı alleller arasında yüksek oranda polimorfizm gösterdiği ve bu allellerden birinde VGVAPG motifinin olmadığı belirlenmiştir (Katzer ve ark 1994). Bu da elastin bağlanma ve bağışık yanıtta korunma varsayımlarına şüphe düşürmektedir. Farklı alleler karşılaştırıldığında SPAG-1'in en fazla korunmuş olan bölgesinin C-terminal kısmı olduğu ve bununda aşı geliştirilmesinde kullanılabileceği düşünülmüştür. İlerleyen dönemlerde, 1A7 monoklonal antikoru kullanılarak C-terminal kısımda proteini nötralize eden bölgenin varlığı tespit edilmiş (Boulter ve ark

1994) ve bunu takiben SPAG-1'in C-terminal kısmı hepatit B merkez antijeni ile birleştirilerek üretilerek (Boulter ve ark 1995, 1997) sığırların aşılmasında kullanılmıştır. Aşılanan hayvanlardaki sporozoit yüzeyini belirleyen antikor titresi oldukça yükselmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada, SPAG-1'in iyi bir T hücre yanıt oluşturduğu ve hem B hücre hem de T hücre epitopu içerebileceği belirtilmiştir. Aynı zamanda, aşılanan hayvanlarda kontrol grubuna kıyasla klinik belirtilerin görülmesinde azalma ve makroşizontları görülme süresinde uzama meydana gelmiştir. Sporozoit aşılarının korumada oynadığı rol tam anlamı ile belirlenememekle birlikte bununla ilgili; (a) sporozoit otonizasyonu; (b) antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksikite (ADCC) ve (c) komplement aracılı sporozoit nötralizasyonu gibi birçok mekanizmalar öne sürülmüştür (Musoke ve ark 1992).

- **Makroşizont antijenleri**

Konakta doğal koruyucu bağışıklığın gelişmesinde makroşizontlar ile enfekte lökositlere karşı oluşan hücre aracılı cevabın önem taşıdığı ve tropikal theileriosis'e karşı geliştirilen rekombinant aşılarla şizont safhasının büyük öneme sahip olduğu belirtilmiştir (Preston ve ark 1999). Tropikal theileriosis'e karşı gelişen doğal bağışıklık genelde diğer suşlara karşı koruma sağlamaktadır (Weir 2006). Aynı zamanda, *T. annulata* ile bulaşmada patogeneze enfekte lökositlerde görülen kontrolsüz çoğalma sonucu oluşur. Bu nedenle, parazitin bu dönemine karşı geliştirilecek olan aşılar hem konak hücre çoğalmasını hem de metastazını engelleyebilir ya da azaltabilir. Sonuç olarak da, hastalığın şiddeti azaltılmış olur (Weir 2006).

*Theileria parva*'da, CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin enfeksiyonun kontrolünde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (McKeever ve ark 1994). Aynı zamanda, sitotoksik T lenfositlerin (CTL) yüksek özgüllükle sadece şizontlar ile enfekte hücreleri belirlediği ve CTL yanıtın parazit suşuna özgü olarak geliştiği bilinmektedir (Morrison ve ark 1987a,b, Morrison 1996, Morrison ve ark 1996). Makroşizontların parazitin hücre içi dönemi olduklarından konakta koruyucu bağışıklığın gelişmesi için parazit ile enfekte hücrelerin belirlenmesi gerekmekte ve bağışık yanıt için gerekli antijenlerin tıpkı *T. parva*'da olduğu gibi konak hücre yüzeyindeki MHC sınıf I molekülleri üzerinde (Morrison ve McKeever 1998) bağışıklık hücrelerine sunulması gerekmektedir. MHC sınıf I molekülü üzerinde parazite ait antijenlerin sunulmasının belirlenmesi teknik açıdan zorlukları beraberinde getirmiştir. Bilindiği üzere parazite ait antijenlerin konak hücre yüzeyinde sunulması için önce MHC I işleminden geçmesi ve bunun sonrasında MHC sınıf I molekülü vasıtası ile enfekte konak hücre yüzeyinde hücresel bağışıklık hücrelerine sunulması gerekmektedir. Bu amaçla, *T. parva*'da parazit

tarafından salgılandıktan sonra konak hücre içinde işlenerek MHC sınıf I molekülleri üzerinde sunulan proteinlerin belirlenmesi için proteinlerin *Saccharomyces cerevisiae*'de fonksiyonel analizlerini içeren ve 'signal dizilim yakalayıcı (signal sequence trapping)' olarak adlandırılan yöntem kullanılmıştır (Musembi ve ark 2000). Daha sonraki dönemlerde *T. parva*'nın genom diziliminin belirlenmesi ile yapılan *in siliko* çalışmalarla salgısal signal peptidlerini kodlayan genler araştırılmıştır (Gardner ve ark 2005). *T. parva*'nın birinci kromozomunda belirlenen 986 genden 55'inin parazit tarafından salgılanarak konak sitoplazmasına geçtiği öngörülmüş ve bunların 36'sı klonlanarak immuno–screening metodu ile MHC I ile sunulan antijenlerin belirlenmesine çalışılmıştır (Graham ve ark 2006). Bu metod temel olarak, transfekte antijen sunan hücrelerin bağışık sıgırlardan izole edilen CTL hücreleri ile belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Sonuç itibari ile, CTL hücreleri tarafından belirlenen antijenleri kodlayan altı gen (T kompleksi protein 1  $\epsilon$ -alt ünitesi, uzama başlatıcı faktör 1A, 151 şok protein 90 (HSP90), sistein proteaz ve iki hipotetik proteindir) tespit edilmiştir (Graham ve ark 2006). Bunların beş tanesinin (HSP90 proteini hariç) immunojeniteleri test edilmiş ve sporozoitlerin öldürücü dozları ile enfekte edilen hayvanlarda hayatta kalmanın istatistiksel olarak CTL hücre yanıtına bağlı olduğu bildirilmiştir. *T. parva*'da belirlenen bu beş antijenden biri olan; polimorfik immunodominant molekül (PIM) bir seri monoklonal antikor kullanarak yapılan çalışmada belirlenmiş ve immün elektron mikroskop ile makroşizontların yüzeyinde yerleştiği bulunmuştur (Shapiro ve ark 1987). Bu antijen farklı izolatlar arasında değişmek koşuluyla 68–95 kDa moleküler ağırlığa sahiptir ve aynı zamanda sporozoitler tarafından da üretilmektedir (Toye ve ark 1991). MAb'ler ile belirlenebilmesine ek olarak, bu antijenin bağışık hayvan serumları kullanılarak yapılan Western blot yöntemi ile farklı *T. parva* stokları arasında değişimler gösteren antijenik epitopların üretildiği şizontlar ile enfekte hücrelerde de belirlenmiştir (Toye ve ark 1991). İki farklı *T. parva* stoğundan elde edilen cDNA dizilimleri karşılaştırıldığında, iki stok arasında 5' yönündeki 71 amino asitten ve 3' yönündeki 208 amino asiten oluşan korunmuş bölgelere karşın 5' ve 3' korunmuş bölgelerini biri birine bağlayan merkezi değişken bölgede amino asit benzerliği %50 seviyesine gerilemiştir (Toye ve ark 1995a,b,c). Proteinin merkezi bölgesinde çok sayıda tekrarlı peptid motifi bulunduğu ve bunların en belirgininin ise QPEP'den oluşan tandem tekrarları olduğu bildirilmiştir. p67 proteinine benzer olarak, PIM'e karşı geliştirilen monoklonal antikorlarında *in vitro* ortamda sporozoitleri inhibe ettiği belirlenmiştir (Toye ve ark, 1995c). Southern blot yöntemi ile PIM'in farklı *T. parva* stokları arasında büyüklük farkına sahip tek kopyalı bir gen olduğu belirlenmiştir (Toye ve ark, 1995a). Buffalo kaynaklı PIM ile Muguga stokuna ait PIM karşılaştırıldığında 5' yönündeki dizilimlerinde yüksek düzeyde sinonim olmayan yer

değişikliklerin olduğu belirlenmiştir. Sinonim olmayan yer değişiklikleri farklı bir amino asit kodlamasına sebep olan DNA dizilimindeki tek nükleotid değişiklikleridir. Sinonim ( $d_S$ ) ve sinonim olmayan ( $d_N$ ) yer değiştirme indeksleri parazit popülasyonlarının karşılaştığı seleksiyonların belirlenmesinde faydalı bir yoldur. Yapılan analizler sonucunda, Muguga PIM proteininin 3' yönünde 55 ve 66. bazlarının olduğu bölgelerde iki intron olduğu görülmüş (Toye ve ark, 1995a) ve bu intronlar sığır ve buffalo kaynaklı birçok gen diziliminde bulunmuştur. Bu bulgular, PIM proteinini kodlayan gen bölgesinde, konağın bağışıklık sistemimin etkisi ile, hızlı bir değişim oluştuğunu göstermektedir (Toye ve ark, 1995a). T hücre epitoplarına ilave olarak PIM proteinin B hücre epitopları da içermektedir. Yapılan çalışmada, PIM proteininin üzerinde en az on adet B hücre epitopu olduğu gösterilmiştir (Toye ve ark 1996). Bu da PIM proteininin hem hücresel hem de humoral bağışıklıkta rol oynadığını göstermektedir. Sığır anti serumu polimorfik merkezi bölgedeki tetra peptid alanla güçlü reaksiyon göstermiş, ancak *in vitro* olarak sporozoitleri nötralize edememiştir. Buna karşın murine kaynaklı mAb'ler ile aynı peptid bölgesini belirlemesi itibari ile PIM ile aşılaman hayvanlarda nötralizan antikorların gelişebileceği düşünülmektedir (Toye ve ark 1996).

Son dönemde, *T. annulata* genomunda PIM ortologu olan protein belirlenmiş ve TaSP (*Theileria annulata* Yüzey Proteini) olarak isimlendirilmiştir (Schnittger ve ark 2002). PIM'e benzer olarak, TaSP'ta tek kopya gen dir ve makroşizont ile sporozoit dönemlerinde üretilmektedir. Bununla beraber, PIM'i kodlayan genle karşılaştırıldığında genin daha küçük olan 315 amino asitlik, 36 kDa molekül ağırlığında olan TaSP'ı kodladığı belirlenmiştir. TaSP ile PIM arasında %55 düzeyinde amino asit benzerliği (5' ve 3' kesimlerde %93 ve merkezi bölgede %10) bulunmakta ve PIM'e analog olarak TaSP merkezi bölgesinde amino asitlerin çoğunlukla negatif yüklü olduğu belirlenmiştir (Schnittger ve ark 2002). Proteinin N terminalinde 19 amino asitten oluşan signal dizilim ve C terminalinde üç adet transmembran alan bioinformatik olarak belirlenmiş ve bu da proteinin N terminal ve merkezi kısımlarının hücre dışında lokalize olduğunu göstermiştir (Schnittger ve ark 2002). Farklı coğrafik bölgelere ait izolatlar karşılaştırıldığında sadece farklı coğrafik bölgeler arasında değil aynı zamanda tek izolata ait farklı klonlarda da farklılıklar görülmüştür. Farklı izolatlara ait TaSP'ın ilk 37 ve son 121 amino asitlik kısmının iyi şekilde korunmuş olmasına karşın 154–171 amino asitlerde arasındaki merkezi bölgesinde değişiklikler ve büyüklük farkları bulunmuştur (Schnittger ve ark 2002). Bu genel yapı PIM'e benzerlik göstermesine karşın TaSP molekülüne ait merkezi bölge daha kısa olup, alleller arasındaki polimorfizm daha azdır ve karakteristik tekrarlı motifler bulunmamaktadır. Araştırmacılar tarafından farklılığın

mutasyon ve intragenik rekombinasyonlar sonucu geliştiği tahmininde bulunulmuştur (Schnittger ve ark 2002). *T. annulata*'nın farklı izolatları ve farklı bölgelerden izole edilen hücre kültürleri kullanılarak yapılan çalışmada, proteinin amino asit düzeyinde yüksek oranda farklılıklara rastlanmıştır (Awadia ve ark 2008).

TaSP molekülünün 26–157 inci amino asitlerinden oluşan kısmı rekombinant olarak üretilmiş ve buna karşı geliştirilen antiserumlar kullanılarak yapılan IFA testi sonucunda molekülün parazit çekirdeği ile makroşizontların yüzeyinde yoğunlaştığı bulunmuştur. *T.annulata* ile enfekte sekiz farklı serum kullanılarak yapılan çalışmada tüm serumların rekombinant protein ile, PIM'deki sonuçlara benzer olarak, kuvvetli reaksiyon gösterdiği bulunmuş (Schnittger ve ark 2002). Bu da TaSP molekülü üzerinde B hücre epitoplalarının varlığını ve bu moleküle karşı konağın geliştirdiği humoral bağışık yanıtı göstermektedir. Bununla birlikte *T. parva* ve *T. annulata* arasında herhangi bir çapraz reaksiyon olup olmadığını belirlemediştir. Ayrıca, Çin'de *Theileria spp.* ile enfekte küçük ruminantlarda alınan serum örnekleri kullanılarak yapılan çalışmada, serum örneklerinin çoğu hem ELISA hem de Western blot ile TaSP ile çapraz reaksiyon göstermiştir ve bu iki tür arasında yüksek oranda benzerlikler olduğunu düşündürmüştür (Miranda ve ark 2004).

TaSP biyoinformatik olarak incelendiğinde, sığır MHC sınıf I (A20) molekülüne bağlandığı düşünülen 22 epitoptan sadece altısının polimorfik merkezi bölgede yerleştiği belirlenmiştir (Schnittger ve ark 2002). Bu epitoplardan 14 adedinin korunmuş bölgelerde olması bize bu protein ile aşılardan sonra gelişebilecek bağışıklığın heterolog suşlarla oluşan enfeksiyonlara karşı koruma sağlayabileceğini düşündürmekle birlikte bununla ilgili bir çalışma yapılmamıştır.

Buna ilave olarak daha sonraki dönemlerde yapılan çalışmalarda, *T. annulata*'nın sporozoit, şizont ve piroplasm dönemlerinde eksprese edilen bir protein belirlenmiş ve TaD olarak adlandırılmıştır (Schneider ve ark 2004). Yapılan çalışmada, bu proteinin tek bir gen bölgesi tarafından kodlanan, 19,5 kDa moleküler ağırlığında, dimerik yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. TaD proteini *T. parva* genom veri tabanı ile nukleotid seviyesinde %70 homoloji göstermektedir. Konfokal mikroskopik analizler bu proteinin baskın olarak parazit sitoplazmasında bulunduğunu göstermiş olmakla birlikte proteinin TaD proteinine karşı geliştirilen antiserum kullanılarak yapılan incelemede şizont yüyündede yerleşim gösterdiği belirlenmiştir (Schneider ve ark 2004). TaD proteininin N terminalinde (1–29) endoplazmik retikulum membranına bağlanmasını sağlayan sinyal dizilimi, merkezi kısmında ise sistein amino asitlerinden oluşan bölge belirlenmiştir. Proteinin C terminalinde (528–537) ve N terminal kısımları farklı *T. annulata* izolatları arasında korunmuş olduğu, merkezi kısmında ise



sistein rezidüleri haricinde amino asit yer değiştirmeleri gözlenmiştir. Proteinin farklı coğrafik bölgelerden elde edilen *T. annulata* izolatları arasında gösterdiği farklılığın parazitin konak bağışıklık sisteminden korunmasında rol oynayabileceğini akla getirmektedir. Yapılan biyoinformatik incelemelerde sığır MHC sınıf I A20 molekülüne bağlanma kapasitesine sahip 12 bölge belirlenmiştir (Schneider ve ark 2004) ve bunların parazite karşı konakta gelişen sitotoksik T hücre yanıtta rol oynayabileceği ve TaD proteininin parazite karşı aşılamalarda kullanılabileceği öngörülmüştür (Schneider ve ark 2004).

İlerleyen dönemlerde yapılan çalışmalar sonucunda, tek bir gen bölgesi tarafından kodlanan, 37 kDa ağarlığında, piroplazm ve şizont dönemlerinde eksprese edilen, farklı parazit suşları arasında yüksek oranda (%95) korunmuş olan *T. annulata* proteini (TaSE) identifiye edilmiştir. TaSE proteinin parazit içerisinde, parazit membranında ve konak hücre sitoplazmasında yerleştiği ve bunlara ilaveten konak hücre mikrotubulleri ile birlikte yerleşim gösterdiği belirlenmiştir. Proteinin yerleşim bölgeleri göz önüne alındığında hücre transformasyonunda rol alabileceği öngörülmüş, buna ilaveten korunmuş amina asit dizilimlerine sahip olması ve konak hücre sitoplazmasına salgılanması proteinin sınıf I molekülleri tarafından konak tarafından sunulabileceğini ve sub unit aşılamalarda kullanılabileceğini akla getirmiştir (Schneider ve ark 2007).

- **Merozoit / Piroplazm Antijenleri**

Ankara (A<sub>2</sub>) hücre kültüründen elde edilen meroziotlerin yüzeyindeki *T. annulata* immunodominant merozit ve piroplazm antijeni olan Tams-1'in belirlenmesi ile bu protein üzerine yoğun çalışmalar yapılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda, TaA<sub>2</sub> stoğundan elde edilen klonlarda bu moleküle ait 30 kDa ve 32 kDa moleküler ağarlığında iki varyant belirlenmiştir (Dickson ve Shiels 1993). Farklı coğrafik bölgelere ait izolatlar karşılaştırıldığında bunlar 30 /32 kDa'luk yapılarına göre sınıflandırılabilir. Alleler arasında korunmuş antijenik epitoplar olmasına karşın, her proteine özgül epitoplar belirlenmiştir (Dickson ve Shiels, 1993). *T. sergenti* üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda baskın meroziot/piroplazm yüzey antijenini (MPSA) kodlayan gen belirlemiştir (Sugimoto ve ark 1991). Sonraki çalışmalarda, 32 kDa'luk bu proteindeki antijenik farklılık ve 23 kDa meroziot/piroplazm proteini belirlenmiştir (Kubota ve ark 1996, Zhuang ve ark 1995).

TaMS1 geni üzerinde yapılan RFLP analizleri daha önce belirlenen iki antijenik forma ait varyant fragmentler belirlenmiş ve buna ek olarak sanılanın aksine farklılığın daha fazla olduğu öngörülmüştür. Analizler sonucunda Tams-1 geninin tek kopya gen olduğu ve bundan dolayı farklı haploid genotiplere uygun genin farklı allellerine ait RFLP profilleri

belirlenmiştir (Shiels ve ark 1995). Tams-1 olarak isimlendirilen gene ait farklı boyutlardaki alleleri Tams-1 (30 kDa) ve Tams1-2 (32 kDa) olarak adlandırılmıştır. Her iki varyantta 281 amino asitten oluşan, N-terminal kısımlarında signal sekansa ve C-terminalinde ise GPI motifi bulunan proteinlerdir. Tams-1 geninin *T. buffeli / orientalis* grubu, *T. sergenti* ve *T. parva* (*TpMS1*) türlerindeki ortologları karşılaştırıldığında yüksek oranda polimorfizm gözlenmiş bu da proteinin N terminaldeki 50 ve 60. kısmındaki muhtemel glikolizasyon bağlanma bölgesinden kaynaklanabileceği, Tams1-1 ve Tams1-2 polipeptidleri arasında gözlenen moleküler ağırlık farkının bu glikolizasyon kısmındaki farklılıktan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ancak bu öngörü daha sonra yapılan çalışmada molekülün N kısmında glikolizasyon bağlanma bölgesi olduğu gösteren her hangi bir kanıt rastlanmaması sonucu (Katzner ve ark 2002) göz ardı edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada Tams-1 genine ait protein eksprese eden kısımların bazı bölümleri birbiri üstüne gelecek şekilde epitoplari belirlenmeye çalışılmış ve sonuçta molekülün tamamına karşı geliştirilen antiserum ile bir monoklonal antikorun proteinin birbirinden bağımsız epitoplari ile reaksiyon verdiği görülmüş ve bununda proteinin tersiyer konformasyonuna bağlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca proteinin korunmuş bölgelerine ait epitoplari tersiyer yapı tarafından maskelenerek konak bağışık yanıtına karşı korurken, farklılaşmış bölgelerin konakta bağışık yanıt oluşması için bağışıklık hücrelerine sunulduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak TaMS1 proteininin kendi ile birleşerek kompleksler, belkide parazit yüzeyinde kafes şeklindepolimerik yapılar oluşturabileceği gösterilmiştir (Katzner ve ark. 2002). Bu dördüncül yapıların parazitin meroziot ve piroplazm formlari yüzeyinde koruyucu bir örtü oluşturabileceği tahmininde bulunulmuştur (Weir 2006). TaMS1 geninde görülen çeşitliliğin araştırılmasında yapılan çalışmalarda kullanılan izolatlarda (Tunus, Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Orta Doğu ve Hindistan) hem amino asit hem de nükleotid bazında aynı oranda başkalık (çeşitlilik yada faklılık) görülmüş ve Tunus populasyonlarında yüksek oranda heterojeniteye rastlanmıştır (Gubbels ve ark 2000, Katzner ve ark 1998, Shiels ve ark 1995). Yukarıda belirtilen sonuçlar ile yapılan dN/dS analizleri, *T.annulata* Tams-1 proteinlerinde pozitif seleksiyon oluştuğunu göstermiştir. Buna ek olarak coğrafik yerleşim ve sekans dizilimi arasında herhangi bir korelasyona rastlanmamıştır (Weir 2006). Amino asit dizilimleri birbirleri ile karşılaştırıldığında proteine ait korunmuş bölgelerin molekülün merkezi değişken kısmında KE (Lys-Glu) ve KEL (Lys-Glu-Leu) korunmuş motiflerinide içine alacak şekilde dağınık olarak yerleşim gösterdiği belirlenmiş ve eritrosit invazyonunda rol aldıkları düşünülmüştür (Molano ve ark 1992). İntragenik rekombinasyonda rol alan altı bölge belirlenmiş ve molekülün korunmuş kısımlarının fonksiyonel/yapısal rol alırken,

değişken bölgelerin konak bağışıklık sisteminden korunmak için gelişim esnasında farklılaştığı öne sürülmüştür (Gubbels ve ark 2000).

*Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* kullanılarak Tams1-1 ve Tams1-2 proteinlerinin iç bölgeleri rekombinant olarak üretilip sığırların aşılmasında kullanılmış ve tüm rekombinant proteinler bağışık sığır serumları tarafından belirlenmiştir (d'Oliveira ve ark 1996). Daha sonra yapılan çalışmada, Tams-1 rekombinat proteini ile aşılana hayvanlarda *T.annulata* kan stabilatı ile oluşturulan re enfeksiyonlara karşı korunma oluşmuş ve her hangi klinik belirti gözlenmemiştir. Kontrol grubuna kıyasla parazitemi seviyesin PCV sonuçları daha düşük çıkmıştır. Aşılana hayvanlardan re enfeksiyon oluşturulmadan önce alınan serum örnekleri kullanılarak yapılan IFA testi sonucunda piroplasmların yüzey kısımlarında reaksiyon oluşmuştur (d'Oliveira ve ark 1997a). Korunma dolaşımdaki anti-Tams1 antikorlarının merozoitlere bağlanıp onları opsonize ederek ya da eritrositlere invazyonu inhibe ederek gelişmiş olabilir. Bununla birlikte re enfeksiyonda kullanılan yöntem sebebiyle çalışmada gözlenen klinik bulguların sadece parazitin eritrositik dönemine karşı geliştiği belirtilmiştir (d'Oliveira ve ark 1997a). Ayrıca, aşılana iki hayvanda rekombinant proteinlere karşı her hangi bir reaksiyon gözlenmemiş ve bu hayvanlardaki bağışıklığın T hücre bağımlı olduğu düşünülmüştür (d'Oliveira ve ark 1997a).

## BÖLÜM 2. ELISA İLE SEROLOJİK TEŞHİSTE KULLANILMAK ÜZERE PROTEİNLERİN BELİRLENMESİ

### 2.1. Genel Bilgi

Tropikal theileriosis'in endemik olarak görüldüğü ülkelerde hastalığın kontrolünde en sık olarak kullanılan yöntem attenüye edilmiş canlı hücre kültürü ile aşılama (Brown, 1990). Hastalığın kontrolünde kullanılan aşılama yöntemlerinin etkinliğinin, aşılanan hayvanların saha şartlarında oluşan tekrarlayan enfeksiyonlara karşı vereceği yanıtın belirlenebilmesi önem taşımaktadır. Ayrıca hastalığın endemik olarak seyrettiği bölgelerde yeni doğan buzağılarda hastalığa karşı oluşan yanıt, bölgeye yeni getirilen hastalığa karşı duyarlı hayvanlarda korumada kullanılan aşılama yöntemlerinin etkinliği ve o bölgedeki parazit popülasyonunda oluşabilecek muhtemel antijenik farklılaşmalar ile bu farklılaşmalara bağlı oluşabilecek yeni epidemilerin belirlenmesi hastalığın kontrolündeki diğer önemli parametrelerdir. Saha şartlarından toplanan örneklerde hastalığın o bölgedeki seyri, yani bölgedeki hayvanların kaçının aşılanmış, kaçının hastalığı atlatarak bağışık hale gelmiş olduğunun ayrımı, oluşan tekrarlayan enfeksiyonların sıklığının ve belli bölgelerde aşılanan hayvanlarda aşının koruyuculuğunun belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden biri de parazite karşı gelişen bağışık yanıt sonucu oluşan özgül antikor miktarlarının ölçümü ve karakterizasyonudur. Bu amaçla aşının etkinliğinin araştırılmasında en sık kullanılan serolojik yöntemlerden biri piroplazm ve / veya makroşizont antijenleri kullanılarak yapılan indirekt floresan antikor (IFAT) testidir (Pipano ve Cahana 1969, Pipano ve ark 1969). Ancak, IFA testi kullanılarak yapılan çalışmalar parazitin farklı yaşam döngülerinde ortak olarak gözlenen antijenler ile reaksiyon göstermesinden dolayı aşılanmış/re enfekte olmamış hayvanların ne aşılı / re enfekte nede doğal olarak enfeksiyonu atlatıp bağışıklık kazanmış hayvanlardan ayrımı yapamamaktadır (Knight ve ark 1998). Bununla birlikte, parazitlerin yaşam döngülerinde her aşamada sentezlenen farklı ve sadece o döneme özgü antijenler bulunmaktadır. Örnek olarak; *Leishmania* türü parazitlerde bulunan 'gp63' isimli yüzey glikoproteini kullanılarak yapılan çalışmalarda mevcut enfeksiyonların daha önceden geçirilmiş olanlardan ayrımının yapılabileceği söylenmiştir (Okong'o-Odera ve ark 1993). Benzer şekilde, *Schistosoma mansoni* adlı trematod da sentezlenen cercarial elastaz enzimi kullanılarak yapılan serolojik çalışmalarda bu enzimin epidemiyolojik çalışmalarda ve hastalar da tedavi dönemi sonrası oluşabilecek cercarial enfeksiyonları özgül olarak belirlediği bildirilmiştir (Ramzy ve ark 1997).

Benzer şekilde, *T. annulata*'nın farklı yaşam dönemleride özgül olarak parazit tarafından sentezlenen ve konak hayvanda humoral bağışık yanıt oluşturan antijenlerin belirlenmesi sayesinde aşılınmış hayvanların doğal yolla enfeksiyona yakalanmış ve/veya re enfekte hayvanlardan ayırımına yardımcı olabilir.

*Theileria annulata* sporozoitleri ile oluşan doğal enfeksiyonlarda konak bağışıklık sistemi parazitin farklı yaşam dönemleri olan sporozoit, makroşizont, merozoit ve piroplasm dönemlerine karşı yanıt oluşturur. Ancak, parazitin attenüye edilmiş ve piroplasm oluşturmadığı düşünülen (Pipano 1977) hücre kültürleri ile aşılınmış hayvanlarda konak vücudunda parazitin sporozoit, meroziot ve piroplasm dönemlerine karşı bağışık yanıt oluşmaz, aşılınmış hayvanlar sadece parazitin makroşizont döneminde sentezlenen proteinler ile karşılaşır ve bunlara karşı yanıt oluşturur. Parazitin sporozoit veya piroplasm dönemlerine özgü proteinler kullanılarak yapılan serolojik testler sadece doğal yolla enfekte hayvanları belirleyip bunların aşılınmış hayvanlardan ayırımına olanak sağlayabilir. Buna ek olarak, parazitin makroşizont dönemine özgü antijenler kullanılarak yapılan serolojik testler yardımı ile hem aşılınmış hemde doğal enfekte hayvanlar belirlenebilir. Tropikal theileriosis'in epidemiyolojik çalışmalarında kullanılabilecek bir diğer yöntemde parazitin farklı yaşam dönemlerine özgül olan bu antijenlerin bir arada kullanılarak test edilen serum örnekleri hakkında daha kapsamlı bilgi edinilmesidir. Bu amaçla; makroşizont dönemine özgü antijenler kullanılarak hayvanların enfeksiyonu taşıyıp taşımadıkları (hem aşılı hemde doğal enfekte hayvanların belirlenmesi) belirlendikten sonra pozitif olan örneklerde parazitin sporozoit dönemine özgül antijenler kullanılarak hayvanlarda enfeksiyonun doğal yolla oluşup oluşturulmadığı ayırt edilebilir. Bir diğer yolda aşılınmada kullanılan attenüye parazit süşunun hayvanlarda piroplasm oluşturma yetisini tam olarak kaybedip etmediğinin belirlenmesidir. Parazitin piroplasm dönemine özgü antijenler kullanılarak aşılı hayvanlarda bu döneme özgü antikorların varlığı araştırılabilir. Bu sebeple parazitin farklı yaşam dönemlerine özgü antijenlerin kullanılması yapılan epidemiyolojik çalışmalarda hastalığın prevalansı hakkında kapsamlı bilgi edinilmesini sağlayıp daha etkili kontrol programlarının oluşturulmasına fayda sağlayacaktır (Ilhan 1999).

Son yıllarda, parazitin omurgalı konaktaki farklı yaşam dönemlerine (sporozoit, şizont, meroziot/piroplasm) özgü antijenler belirlenmiş ve bunlar ELISA'da kullanılmıştır. Bu antijenler arasında, sporozoit yüzey antijeni; SPAG-1 (Hall ve ark 1992, Williamson ve ark 1989), merozoit yüzey antijeni; Tamr-1 (Shiels ve ark 1994), 32 kilo dalton (kDa) meroziot ve piroplasm yüzey antijeni; Tams-1 (Shiels ve ark 1995), merozoite rhoptri antijeni; TA08425 (genedb ID) (Ilhan ve ark 1998). *T. annulata* yüzey antijeni; TaSP (Schnittger ve ark 2002),

şizont yüzey antijeni; TaD (Schneider ve ark 2004), şizont proteini; TaSE (Schneider ve ark 2007), mitokondriyal HSP70; TamtHSP70 (Schnittger ve ark 2000). Özellikle, *T. annulata*'nın genomik diziliminin belirlenmesi (Pain ve ark 2005) ve biyoinformatik yöntemlerin yardımı ile parazitin farklı dönemlerinde yüksek oranda sentezlenen, dizilimde belli amino asit alanlarına sahip antijenik özellikleri olan proteinlerin belirlenmesine olanak sağlamıştır. Bu proteinler arasında 23 kDa'luk piroplasm yüzey proteini, Mero-1, sub-telomerik bölgede bulunan *SVSP* gen ailesi içinde belli genler arasındaki korunmuş bölgelerin sentezlediği ortak protein bölgelerinin rekombinant proteinleri, RP2 ve RP4 (Weir 2006) bulunmaktadır. Bahsedilen proteinler ile ilgili bilgiler ileriki kısımlarda verilecektir.

Bu bölümde;

- I. Biyoinformatik yöntemler kullanılarak *T. annulata*'nın makroşizont dönemine özgü proteinlerin belirlenerek klonlanıp üretilmesi ve proteinlere karşı bağışık yanıtın deneysel enfekte hayvan serumları ile western blot metodu kullanılarak incelenmesi,
- II. TaSP'in immunodominat makroşizont antijeni olup olmadığının belirlenmesi ve immunodominant bantların tanımlanması,
- III. TaSP, Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenleri kullanılarak indirek ELISA testlerinin geliştirilmesi,

amaçlanmıştır. Bu doğrultuda belirtilen amaçların gerçekleştirilmesinde kullanılan yöntem, elde edilen sonuçlar ve tartışma her amaç için ayrı olacak şekilde anlatılmıştır.

## **2.A. Biyoinformatik Yöntemler Kullanılarak *T. annulata*'nın Makroşizont Dönemine Özgü Proteinlerin Belirlenmesi, Bu Proteinlerin Klonlanıp Üretilmesi ve Proteinlere Karşı Bağışık Yanıtın Deneysel Enfekte Hayvan Serumları Kullanılarak Western Blot Metodu ile İncelenmesi**

*Theileria annulata*'nın genom diziliminin belirlenmesi ve dizilimde protein kodlayan gen bölgelerinin ortaya çıkarılması (Pain ve ark 2005) epidemiyolojik çalışmalar ile tropikal theileriosis'e karşı yeni, kolay ve etkili sub unit aşıların geliştirilmesinde kullanılabilecek antijenleri kodlayan genlerin belirlenmesi için alternatif yöntemlerin kullanılmasına olanak sağlamıştır. Gün geçtikçe artarak çoğalan ve içerisinde farklı organizmaların gen dizilimlerini barındıran veri tabanlarında, yapılacak çalışmalarda belirlenen amaca uygun olarak, ilgili antijenleri kodlayan gen bölgelerinin belirlenmesinde kullanılan biyoinformatik yöntemler sayesinde bu veri tabanlarındaki bilgileri yorumlayarak uygun gen bölgelerini belirleme olasılığı ortaya çıkmıştır (Fields ve ark 1999). Genom dizilimi belirlenmiş patojen türlere karşı uygulanacak aşılama programlarında kullanılmak üzere antijenlerin belirlenmesi amacıyla kullanılan farklı yaklaşımlar mevcuttur. Bu çalışmalarda önemli sayıda gen veya bunların ürünlerinin özgül ve duyarlı bir bağışık cevap oluşturup oluşturmadığına bakılmıştır, ancak bu amaçla kullanılan yöntemlerde çok sayıda gen bölgesinin klonlanması ve elde edilen ürünlerin fonksiyonel/immunolojik analizlerinin yapılması uzun ve zahmetli çalışmalar gerektirmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmaların temelini belirlenen biyoinformatik yöntemlerle ilgili etkenin genom incelemeleri ve bunu takiben yapılan immunolojik analizler oluşturmaktadır. B grubu Streptokoklara (GBS) karşı koruyucu aşılmalarda kullanılmak üzere yüzey ilişkili, salgısal proteinlerin belirlenmesi için yapılan biyoinformatik incelemede sekiz farklı GBS genomu incelenmiş ve etkene ait genomun %80'inin bu suşlar arasında ortak olarak bulunduğu, 765 genin ise bütün suşlar arasında değişkenlik gösterdiği ve bunlardan 589 gen bölgesi ise aşı çalışmalarında kullanılabilecek yüzey ilişkili, salgılanan proteinler olduğu belirlenmiştir (Maione ve ark 2005). Klonlanıp, eksprese edildikten sonra *in vivo* ortamda aşılama çalışmalarında kullanılan proteinler arasında bir tanesinin suşlar arasında ortak olarak görülen antijen, üç tanesinde ise suşlar arasında farklılık gösteren antijenler olduğu ve aşılamının hayvanlarda değişken bir koruyuculuk şekillendirdiği gözlenmiştir (Maione ve ark 2005). Sonuçta, canlı bakteri yüzeyinde sunulan antijene bağlanan antikor seviyesine bakılarak antijenin bakteri yüzeyinde sunulma miktarı ile antijenin oluşturduğu koruyucu bağışıklık arasında korelasyon olduğu gözlenmiştir (Maione ve ark 2005). Bu yöntemle elde edilen koruma tüm suşlara karşı eşit oranda olmamasına rağmen dört proteinin

kombine halde kullanılması ile yapılan aşılmalarda hayvanların farklı suşlarla tekrarlayan enfeksiyonlara karşı korunduğu görülmüştür. Bu çalışmayla elde edilen sonuçlara dayanarak biyoinformatik yöntemlerle belirlenen antijenlerin etkinliğinin özgül olarak yüzey membranında sunulmasının önemli olduğu görülmektedir. Aynı zamanda belirlenen antijenlerin suşlar arasındaki farklı düzeylerdeki yüzey sunumları, moleküllerin biyoinformatik yöntemler ile belirlenmesinde yüksek düzeylerde eksprese edilmelerinin yanı sıra farklı suşlar arasında ortak olarak korunmuş fonksiyonel işaret ve membran bağlanma motiflerinin belirlenmesinin önemine işaret etmektedir. *Streptococcus pneumoniae* (Wizemann ve ark 2001), *Chlamydia pneumoniae* (Montigiani ve ark 2002), *Porphyromonas gingivalis* (Ross ve ark 2001) ve *Neisseria meningitis*'e (Pizza ve ark 2000) karşı aşılama programlarında kullanılacak antijenler veri tabanında kayıtlı proteinlere benzerlikleri ve motif işaretlerinden yararlanılarak yapılan biyoinformatik çalışmalar ile belirlenerek bu antijenlerin eksprese eden rekombinant proteinler ileriki aşı çalışmalarında kullanılmak üzere belirlenmiştir. *Mycoplasma tuberculosis* tarafından salgılanan proteinlerin koruyucu bağışıklıkta rol oynaması bu etkene karşı aşılama programlarında kullanılabilecek antijenlerin belirlenmesinde SignalP ve benzeri biyoinformatik programları kullanılarak etkenin genomunda bulunan muhtemel salgılanan proteinleri belirlemişlerdir. Yine T hücre epitoplarını belirleyen model eşleme algoritim programları yardımıyla çoklu epitop içeren proteinlerin *in vitro* çalışmalarda kullanılması amacıyla da biyoinformatik yöntemler kullanılmıştır (De Groot ve Rappuoli 2004). Protozoal bir etken olan *Trypanozoma cruzi*'ye karşı aşı çalışmalarında kullanılacak antijenlerin belirlenmesinde birleştirilmiş immunolojik ve biyoinformatik çalışmalar yapılmıştır (Bathia ve ark 2004). Ökaryotik hücrelerde yüzey proteinleri buldukları membranlara glikosil-fosfatidilinositol (GPI) alanları ile kovalent olarak tutunurlar. Genelde GPI tutucular proteinlerde çok sık olarak görülen değişikliklerden (modifikasyon) biri değildir ve proteinlerde bu motifin bulunması yapılacak biyoinformatik çalışmalarda ayırıcı bir parametre olarak kullanılabilir. *T. cruzi*'ye karşı gelişen koruyucu bağışıklığın şekillenmesinde GPI tutuculu proteinlerin etkinliğinin bilinmesi aşılmalarda kullanılabilecek antijenlerin belirlenmesinde eksprese edilen sekans işaretleyicileri (Expressed Sequence Tag: EST) ve genom dizilim belirleme (GSS: Genome Sequence Survey) veri tabanlarının incelenmesine olanak sağlamıştır (Bathia ve ark 2004). Salgılanan ve GPI tutucuları ihtiva eden proteinlerin belirlenmesinde 2500 dizilim içerisinde yapılan araştırmada karakteristik olarak bu özellikleri içeren 19 dizilim belirlenmiş ve bunlarında sekiz tanesinin parazitin birçok yaşam döneminde sentezlenen ve iyi korunmuş yüzey proteini olduğu belirlenmiştir. Belirlenen bu proteinler eukaryotik plazmidler içerisinde klonlanarak farelerde



DNA aşılı olarak kullanılmıştır. Bağışık serumlarla yapılan ELISA sonuçları hayvanlarda antijenlere özgü poliklonal serumların oluştuğunu göstermiştir (Bathia ve ark 2004).

*Theileria parva*'ya karşı hayvanlarda koruyucu bir bağışık yanıtın oluşabilmesi için şizontlarla enfekte lökositlerin yüzeyinde bulunan MHC sınıf I moleküllerince sunulan parazite ait peptidlerin CD<sup>8+</sup> sitotoksik T hücreleri tarafından belirlenmesi gerekmektedir (Morrison ve ark 1995). *T. annulata*'ya karşı gelişen bağışık yanıtta oluşan sitokin profili ve T hücrelerinin litik etkisine bakıldığında CD<sup>4+</sup> ve CD<sup>8+</sup> hücreleri bağışıklığın oluşmasında rol oynamaktadır (Ahmed ve ark 1989, Preston ve ark 1999). Bağışıklığın gelişmesinde makrofajları enfekte eden diğer patojen organizmalarda olduğu gibi T hücre bağımlı ve T hücre bağımsız bağışıklık sistemlerinin ortaklığıyla oluştuğu ve makrofajların uzun süreli bağışıklıkta önemli rolü olduğu bilinmektedir (Ahmed ve ark 1989, Preston ve ark 1999). Teorik olarak, proteinler üzerinde T hücre epitoplalarının bulunması bu proteinin antijenik olduğunu işaret etmektedir. Proteinler üzerinde bu motiflerin *in siliko* olarak incelenmesi yoluyla bu motifleri kodlayan genlerin antijenitelerinin belirlenebileceği öngörülebilir. Biyoinformatik yöntemlerle yapılan incelemede makroşizont antijeni olan TaSP molekülünün korunmuş ve değişken bölgeleri üzerinde MHC sınıf I molekülleri belirlenmiştir (Schnittger ve ark 2002). Ancak, sığır T hücre epitoplalarının belirlenmesinde kullanılan mevcut programların azlığı ve genelde insan MHC allelerinin belirlenmesinde kullanılan programların sığır epitoplalarının belirlenmesi amacıyla kullanılması ve B hücre epitop belirleme programlarının genelde veri tabanında kayıtlı olan ve fonksiyonel olarak B hücre epitoplarnı içerdiği bilinen motifler ile benzerliklerinin karşılaştırılması prensibine dayandığı için epitop belirlemede kullanılan programların uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır (Reitmaier 2007). Bu aşamada *T. annulata* antijenlerinin içerdiği epitoplarnın belirlenmesinde kullanılacak programlar ile elde edilecek sonuçlar tartışmalı olacaktır. T hücre yanıtına ilaveten makrofajlar uzun süreli bağışıklığın gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (Preston ve ark 1999). Ne yazık ki, makrofajlarda parazite bağı görülen uyarılmanın nasıl gerçekleştiği tam olarak anlaşılamamıştır. Biyoinformatik yöntemlerin sınırlı olması parazite karşı gelişen doğal bağışıklıkta görev alan antijenleri belirlemek için kullanılabilir yöntemlerin özgüllüğünü sınırlamaktadır. Bununla birlikte, doğal bağışıklıkta rol oynayabilecek antijenlerde bulunan motiflerin belirlenmesi *in siliko* genom araştırmalarında alternatif olarak kullanılabilir. *T.annulata*'nın invazif hücre dışı dönemleri olan sporozit ve merozoit dönemlerinde bulunan yüzey proteinlerinin kısa süreli de olsa sığır bağışık sistemi ile karşılaştığı ve bunlara karşı bir yanıtın oluştuğu göz önüne alındığında bu dönemlere özgü antijenlerde bulunan motiflerin belirlenmesinde de biyoinformatik yöntemlere başvurulabilir. Bu proteinlerin

belirlenmesinde; (1) antijenlerin parazitin hücre dışı dönemlerinde sentez edildiğinin belirlenmesi, (2) parazit tarafından salgılanıyor olması ve (3) parazit yüzeyine bağlanması gibi özellikleri kullanılabilir. Parazite ait makroşizont dönemi hücre içi olup oldukça komplekstir. Parazitin bu dönemine ait sentez edilen sekans işaretleyicileri (Expressed Sequence Tag: EST) verilerine bakıldığında çok sayıda gen (1407) tarafından protein sentezi yapılırken bu sayı merozoit (855) ve piroplasm (838) dönemlerinde azalmaktadır (Pain ve ark 2005). Sporozoit dönemine ait EST verileri mevcut olmadığı için parazitin bu dönemine ait veri bulunmamaktadır. *T. annulata*'nın kodladığı Tams-1, SPAG ve TaSP gibi proteinlerde işaret peptidleri bulunmaktadır (Katzner ve ark 1994, d'Oliveira ve ark 1996). Buna ek olarak, TaSP molekülde muhtemelen proteinin parazit mebranına bağlanmasını sağlayan üç transmembran alan bulunmaktadır (Schnittger ve ark 2002). SPAG ve Tams proteinleri GPI tutunma alanı (GeneDB) ihtiva etmektedir. Genellikle bu tür proteinlerde transmembran alan, sitoplazma içerisinde bir uzantı halinde bulunmakta ve özellikle plasma membranının hücre dışı kısmında lokalize olmaktadır. Protozoalarda, GPI bağlayıcıların ağırlıklı işlevi hücre yüzey proteinlerini lipid katmanla birleştirmektir (Turner 1994). Bundan dolayı, parazitlerin hücre dışı invazif dönemlerinde genlerin kodladığı proteinlerde GPI tutucular belirgin, parazitin hücre içi dönemlerinde çoklu transmembran alanlar kullanılmaktadır. Bu veriler göz önüne alındığında işaret peptidleri ve GPI bağlayıcıların birlikte bulunması sporozoit ya da meroziot yüzey antijenleri için önemli bir işaret olduğu görülmektedir. *T. annulata* genomunda 3793 proteini kodladığı düşünülen gen bölgeleri arasından saha şartlarında epidemiyolojik çalışmalar ile aşılama programlarında kullanılacak olası antijenlerin belirlenmesi (Weir 2006) ve bu proteinlerin yapılacak çalışmalar ile desteklenmesi önem taşımaktadır.

## 2.A.1. Gereç ve Yöntem

### 2.A.1.1. Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali ve Protein Ekstraktlarının Hazırlanması

Çalışmada *T. annulata*'nın 16 farklı izolatu (Ankara / D7, Ankara / TaA2, Ankara / A46, Ankara / J1 – 1, HAO, Pendik, Aydın, Diyarbakır, Yenihisar, Caceras, BAT – 2, JED–4, Umbaneai, Shambai, Gharb, Ode), *T. parva* Muguga ve *T. lestoquardi* Lahr ait makroşizont hücre kültürleri ile enfekte olmayan sığır lenfosarkoma (BL20) hücreleri kullanılmıştır (Çizelge 2.A.1). SDS–PAGE ve western blotlama çalışmalarında kullanılan protein ekstraktları yukarıda belirtilen taze, *in vitro* hücre kültürlerinden hazırlanmıştır. Özet olarak; 25 ml'lik flasklar içinde bulunan 10 ml miktarındaki iki günlük hücre kültürlerinin thoma lamında yapılan hücre sayımı ve canlılık oranları belirlendikten sonra 15 ml'lik steril plastik tüplerde 1500 devirde +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek hücrelerin dip kısmında toplanması sağlanmıştır. Çökeltinin üst kısmındaki sıvı dikkatlice dökülerek dipte kalan çökelti 10 ml bir kezlik fosfat tampon solüsyonu (1 x PBS; 80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 450 ml distile su içerisinde, pH 7.4) içinde tekrar süspanse edilerek yukarıdaki şekilde santrifüj edilip hücreler dipte toplanmıştır. Bu işlem toplam üç kez tekrar edilerek hücrelerin yıkanması sağlanmıştır. Daha sonra yıkanan hücreler mililitresinde 10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde bir kezlik protein ekstraksiyon solüsyonu (içerisinde 0.25M Tris-HCl, pH 6.8, %4 SDS, %20 gliserol, %10 β-merkapt ethanol, %0.001 bromofenol mavisi ihtiva eden dört kezlik solüsyondan dilüye edilerek hazırlanmıştır) kullanılarak sulandırılmış ve protein örnekleri üç, dört kez şırınga yardımı ile ince uçlu iğneden geçirildikten sonra 5 dakika boyunca kaynayan suda bekletilmiştir. Son aşamada ise örneğin içerisinde parçalanmayan kısmın dipte toplanması amacıyla 14000 devirde +4°C'de beş dakika boyunca santrifüj edilerek üstteki sıvı başka bir tüpe aktarılarak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

**Çizelge 2.A.1.** Protein ekstraktlarının hazırlanmasında kullanılan parazit stoklarının türü ve orijinini

Parazit türü	Stok orijini Ülke	Yer yada isim	Materyal	Kaynak
<i>Theileria annulata</i>	Türkiye	Ankara/D7	Kültür	Edinburg Üni.,CTVM
" "	" "	TaA2/Ankara	"	" "
" "	" "	A46	"	" "
" "	" "	J1-1	"	" "
" "	" "	HAO	"	ADÜ.Vet.Fak.Parazit.AD.
" "	" "	Pendik	"	Özkoc ve Papino,1981
" "	" "	Aydın	"	ADÜ.Vet.Fak.Parazit.AD.
" "	" "	Diyarbakır	"	Weir, 2006
" "	" "	Yenihisar	"	ADÜ.Vet.Fak.Parazit.AD.
" "	İspanya	Caceras	"	" "
" "	Tunus	BAT-2	"	" "
" "	Tunus	JED-4	"	BenMiled ve ark., 1994
" "	Sudan	Umbaneai	"	Shiels ve ark., 1986
" "	Sudan	Shambai	"	" "
" "	Mısır	Gharb	"	Ouhelli ve ark., 1989
" "	Hindistan	Ode	"	Baylis ve ark., 1992
<i>Theileria parva</i>	Kenya	Muguga	"	Oura ve ark., 2003
<i>Theileria lestoquardi</i>	İran	Lahr	"	Kıvrar ve ark., 1998
BL20	İskoçya	Glasgow	"	Bilinmiyor

### 2.A.1.2. *Theileria annulata*'nın Makroşizont Dönemine Özgü Proteinlerin Biyoinformatik Yöntemle Belirlenmesi

Biyoinformatik kısaca bilgi teknolojisinin moleküler biyoloji alanında uygulanması olarak tanımlanabilir. Daha kapsamlı bir anlatımla biyoinformatik uygulamalar biyolojik bilgilerin değerlendirilmesi ve analizinden kaynaklanan teorik ve pratik sorunların çözülmesi amacıyla veri tabanları, algoritmeler, bilgisayar ve istatistiksel tekniler ile teoriler oluşturularak bunların ilerletilmesine olanak sağlamaktadır. Bu yolla araştırmacılar veri tabanlarında bulunan bilgileri çeşitli biyoinformatik programlar ile değerlendirerek kendi çalışmalarında kullanarak uzun, zahmetli ve pahalı olan laboratuvar çalışmalarında hem zaman kazandırmakta hem de bilgilerin daha doğru olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. *T. annulata*'nın genom dizilimi Pain ve ark (2005) tarafından yayımlandıktan sonra <http://www.genedb.org/> internet adresindeki veri tabanında annotate edilmiş halde bulunmaktadır. EST verileri en son 2005 yılında bu veri tabanına eklenmiş ve araştırmacılara yapacakları çalışmalarda kaynak oluşturmuştur. Bu veri tabanında annotate edilen gen bölgesine ait ayrıntılı bilgi mevcut olup araştırılmak istenen gen bölgesine ve bu genin kodladığı proteinin özellikleri ayrıntılı olarak verilmiştir.

Signal P, protein kodlayan gen bölgeleri tarafından sentezlenen peptid zincirlerinin N yada C terminal kısımlarında bulunup bunların hücre içerisinde kullanılacakları bölgelere taşınmasından sorumlu kısa (3–30 amino asit uzunluğunda) peptid zincirleridir. Sentezlenen proteinler taşıdıkları Signal peptid de bulunan amino asitlerin hidrofobik ve/veya pozitif yüklü olmasına göre aracı moleküller yardımı ile endoplazmik retikulum, çekirdek, çekirdekçik, mitokondriyal matriks yada peroksizomlara taşınıp buralarda işlendikten sonra hücrede çeşitli biyolojik ya da immunolojik faaaliyetlerde kullanılmaktadır. Glikofosfotidilinoitol (GPI), proteinlerde sentezlenme sonrası oluşan değişikliklerle C terminal uca bağlanan bir glikolipittir. Hidrofobik fosfotidil–inositol group içinde bulunan iki yağ asidi yardımı ile bu proteinler hücre yüzeyine bağlanırlar. Transmembran domain (TMD), transmembran proteinlerin tek transmembran alfa helikal kısmını belirtmekte ve genel olarak proteinleri oluşturan peptid dizilerinin tümünün ya da belli kısımlarının membrana gömülü olarak bulunduğunu belirtmede kullanılan bir terimdir. Expressed sequence tag (EST), genom içinde sentezlenen mRNA'lerden oluşturulan cDNA dizilerinin kısa alt dizilimleri olarak tanımlanmaktadır. Gen kopyalarının belirlenmesi, gen bölgelerinin tanımlanarak bunlara ait dizilimlerin belirlenmesi ve proteinlerin sentezlenme miktarının karşılaştırılmasında kullanılmaktadır.

*Theileria annulata*'nın çekirdek genomu (8.35 Mb), *T. parva* (8.3 Mb) ile benzer büyükte olup, boyutları 1.9–2.6 Mb arasında değişen dört kromozom ile 6 kb büyüklüğünde bir mitokodrial genom ve birde büyüklüğü tam olarak bilinmeyen apikoplast genomunlarını içermektedir. G+C içeriği %32.54 olup genomda 3792 protein kodlayan gen bölgesi olduğu tahmin edilmektedir. Bu genlerin 3265 tanesi *T.parva* genomunda bulunan genler ile ortolog özellik göstermesine karşın, 493 genin ortoloğu yoktur, ayrıca *T. annulata* genomunda bulunan 34 gende sadece bu türe özgüdür. *T. annulata* genomu hakkındaki ayrıntılı bilgi Çizelge 2.A.2'de verilmiştir. Buna ek olarak, toplam 49 tRNA ile beş ribozomal RNA (rRNA) geni bulunmaktadır. *T. annulata* ve *T. parva* genomunda benzer uzunluk, düzen ve baz kompozisyonuna sahip telomerik ve subtelomerik alanlar bulunmaktadır (Pain ve ark 2005). Subtelomerik genlerin büyük çoğunluğunun salgı proteinlerini kodladığı düşünülmektedir. *T. annulata* genomunda kodlanan üç büyük çoklu kopyaya sahip gen ailesi bulunmaktadır. Bunlar, telomerler ile bağlantı noktasında yer alan ve 64 paralog gen ihtiva eden *Sfi*, dört kromozoma dağılmış halde bulunan ve 83 paralog gen içeren *Tar* ve subtelomerik bölgede yer alıp 51 paralog genden oluşan SVSP gen aileleridir.

**Çizelge 2.A.2.** *Theileria annulata* ve *T. parva* genomunda bulunan protein kodlayan genlerin kompozisyonu (Pain ve ark 2005).

<i>Theileria</i>		
Özellik	<i>T.annulata</i>	<i>T.parva</i>
<b>Çekirdek genomu</b>		
Boyut (bp)	8351610	8308027
Contig sayıları	7	8
Kromozom sayısı (Mb)	4 (1.9–2.6)	4
Toplam G+C içeriği (%)	32.5	34.1
Protein kodlayan gen sayısı	3792	4,035
İntron içeren genler (%)	70.6	73.6
Ortalama gen uzunluğu (bp)	1,606	1,407
Kodlayan bölge yüzdesi	72.8	68.4
Kodlayan bölge yüzdesi (intronlarla birlikte)	81.8	80.2
Ortalama (orta) intergenik uzunluk (bp)	396 (263)	402 (281)
İntergenik bölgelerin G+C içeriği (%)	22.5	24.9
Ortalama (orta) intron uzunluk (bp)	69 (48)	94 (63)
İntronların G+C içeriği (%)	22.2	23.6
<b>Protein kodlamayan RNA</b>		
tRNA	47	47
5SrRNA	3	3
5.8S, 18S, 28S rRNA ünitesi	2	2
<b>Mitokondriyalgenom (kb)</b>	6	6
<b>Apikoplastgenomu (kb)</b>	Bilinmiyor	39.5

Ortolog genler arasında sinonim ve sinonim olmayan değişimlerin oranı (dN/dS) genler üzerindeki gelişme ile ilgili (evrimsel) baskının değerlendirilmesi, ayrıca immunojenik özellik gösterebilecek genlerin belirlenmesinde kullanılabilir (Endo ve ark 1996, Pain ve ark 2005). *T. annulata*'da, *Plasmodium*'a benzer şekilde merozoit yüzey proteinlerini kodlayan genlerde dN/dS oranları yüksek bulunmuş ve bu proteinlerin immun seleksiyonda rol oynayabilecekleri düşünülmüştür (Gubbels ve ark 2001, Hall ve ark 2005). Makroşizont döneminde signal peptidi (SP) içeren polipeptidlerin dN/dS oranları yüksek bulunmasına karşın bu oranın merozoit döneminden daha düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, lökosit sitoplazmasına salınan ve herhangi bir membran bağlanma motifi içermeyen makroşizont proteinlerinde dN/dS oranı yüksek olarak bulunmuştur. Konağa salgılanma ile ilişkili olarak belirlenen yüksek dN/dS oranı bu genlerin düzenleyici rollerini yansıtabileceği düşünülmüştür. Alternatif olarak bu yüksek oran yıkılan proteinlerin doku uyumu kompleksleri ile enfekte hücre yüzeyinde sunularak immun sisteme maruz kalınmasında ifade edebilmektedir. Bunu incelemek için yapılan çalışmalarda polipeptidlerin çoğunda PEST motiflerine rastlanmıştır (Pain ve ark 2005). PEST motifi; prolin (P), glutamik asit (E), serin (S) ile threonin (T) amino asitlerinden oluşan ve sentezlenen polipeptidlerde hızlı protein yıkılması için signal peptid görevini gören alanlardır. PEST motifi içeren proteinlerin büyük bölümünü çekirdek lokalizasyon sinyali içeren TashHN, TashAT ve SUAT proteinleri oluşturmaktadır (Pain ve ark 2005).

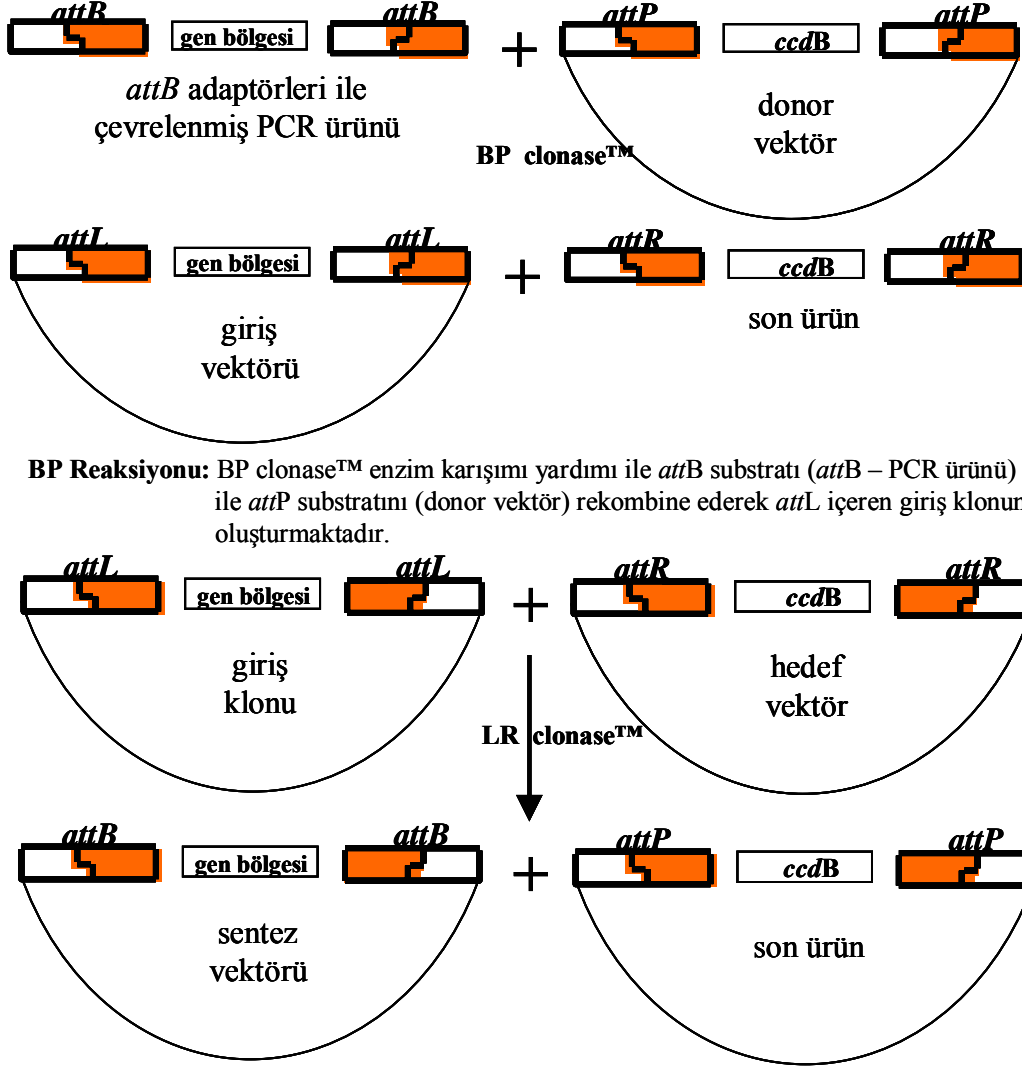
Biyoinformatik yolla *T. annulata*'nın makroşizont dönemine özgü proteinlerin belirlenmesinde bu veri tabanı baz alınarak kodlanan proteinler Signal P, GPI anchor, TMD ihtiva edip etmedikleri, hangi protein ailesi içerisinde yer aldıkları, EST verileri ve dN/dS oranlarına bakılarak birbirleri arasında karşılaştırılmış ve elde edilen veriler ilgili proteinlerin parazitin hangi yaşam döneminde ne miktarda üretildiğine bakıldıktan sonra tüm veriler excel formatında bir sayfada toplanarak yukarıdan aşağıya doğru dizilip uygun olanları seçilmiştir. Daha sonra klonlanarak rekombinant olarak çoğaltılıp western blotlama yöntemi ile ilgili proteinlere karşı hayvanlarda oluşan humoral yanıt açısından değerlendirilmiştir. Ek olarak parazitin merozoit/piroplasm dönemlerinde sentezlenen 30/32 kDa'luk merozoit/piroplasm yüzey antijeni, Tams-1/2, 23 kDa'luk piroplasm yüzey proteini, MeroI, sporozoit yüzey antijeni olan SPAG-1 ile makroşizont döneminde sentezlenmesine karşın şaperon proteini olarak görev yapan TA10720 ve TA06470 gibi HSP90 homolog proteinleri ile yine makroşizont döneminde salgısal protein olarak görev alan SVSP gen ailesinde bulunan proteinlerin ortak korunmuş bölgelerini kapsayan RP2 ve RP4 rekombinant proteinleri



mevcut gliserol stoklarından üretilip pürifikasyona tabi tutulduktan sonra konak tarafından oluşan humoral yanıt yönünden western blot yöntemi ile incelenmiştir.

### 2.A.1.3. Belirlenen Proteinleri Kodlayan Gen Bölgelerinin Klonlanması

Biyoinformatik yöntemler kullanılarak belirlenen proteinler Gateway Teknolojisi (İnvitrogen) kullanılarak klonlanmıştır. Bu sistem kısaca proteinleri kodlayan ilgili gen bölgelerinin genomik DNA'dan adaptörlü primerler kullanılarak PZR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra lamda bakteriofaj sistemleri içerisine adaptörler yardımıyla 5'→3' yönünde, özgül olarak enzimler vasıtası ile (BP rekombinasyon işlemi) bağlanması ve bunu takiben istenilen gen bölgesini içinde barındıran *E.coli* hücreleri çoğaltılarak proteinlerin üretilmesi ve affinite kromatografi yöntemi ile saflaştırılmaları aşamalarından oluşmaktadır (Şekil 2.A.1). Biyoinformatik yolla belirlenen proteinlerin klonlanarak rekombinant olarak üretilmeleri için kullanılan adaptörlü primer çiftleri Artemis\_V9 bilgisayar programı yardımı ile proteinleri kodlayan bölgeleri çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır. Kullanılan primer çiftlerinin dizilimleri, çoğaltılan bölgenin uzunluğu (bp) ve bölge tarafından kodlanan proteinlerin moleküler ağırlıkları (kDa) Çizelge 2.A.3'de gösterilmiştir. Gen bölgelerini çoğaltmada kullanılan her primer çifti 5' yönünde ileri ve geri yönlü *attB* (ileri yönlü *attB* adaptörü; GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC-, geri yönlü *attB* adaptörü; GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTA-) adaptör sistemleri içermekte ve proteini kodlayan gen bölgesini çoğaltan ilgili bölgelere özgül primerler ise ileri ve geri yönlü *attB* adaptörlerine 3' yönünde eklenerek kullanılmaktadır. Bu amaçla uygulanan PZR 50 µl'lik son hacimde, 45 mM Tris – HCl, pH 8.8, 11 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.113 mg / ml BSA, 4.4 µM EDTA, herbir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP' tan 1 mM, 1 U Ampli *Taq* DNA polimeraz (Applied Biosystems), 10 µM ileri ve geri yönlü primer çifti ile 2 µl DNA örneği içermiştir. Reaksiyon Techne TC-512 marka otomatik termal sikluslu makine kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon 94°C'de 3 dakikalık ön denaturasyonu takiben, her siklus denaturasyon (95°C'de 50 saniye), bağlanma (50°C'de 50 saniye) ve uzama (65°C'de 1 dakika) aşamalarından oluşmak üzere 30 siklus ve 65°C'de 10 dakikalık son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



**BP Reaksiyonu:** BP clonase™ enzim karışımı yardımı ile *attB* substratı (*attB* – PCR ürünü) ile *attP* substratını (donor vektör) rekombine ederek *attL* içeren giriş klonunu oluşturmaktadır.

**LR Reaksiyonu:** LR clonase™ enzim karışımı yardımı ile *attL* substratı (giriş klonu) ile *attR* substratını (hedef vektör) rekombine ederek *attB* içeren sentez vektörünü oluşturmaktadır.

**Şekil 2.A.1.** Bakteriofaj lambda integraz (Int) ve *E.coli* integrasyon konak faktör proteini (IHF) ihtiva eden BPclonase™ enzim karışımı tarafından katalize edilen lizojenik yol ile bakteriofaj lambda integraz (Int), ekسیونаз (Xis) ve *E.coli* integrasyon konak faktör proteini (IHF) ihtiva eden LR clonase™ enzim karışımı tarafından katalize edilen litik yolla oluşan Gateway rekombinasyon reaksiyonunun şematik görünümü.

**Çizelge 2.A.3.** Biyoinformatik yöntemlerle belirlenen proteinlerin klonlamasında tasarlanan primer çiftleri ve bunların dizilimleri

Gen adı (Genedb)	Ürün	Dizilim <sup>a</sup>	Mol.ağırlık (kDa)	Çoğaltılan bölge uzunluğu (bp)
TA20440 (I.kısım)	Hipotetikal membran proteini	F;GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC GAAAATTTTAAACAATAAAAGGTGT R;GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA TTGAGACTCCATGTCTCTCATGGT	12	318
TA20440 (II.kısım)	" "	F;GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC TCTCGTTCTTTAATCAGCACTTCT R;GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA CTCCCAAAATCAAATGTGAGTAA	5	141
TA13755 (I.kısım)	Hipotetikal protein	F;GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC GAACTTTTACCACACACCGGTGAT R;GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA GGGTTTTTCAAATCCTGAAGGTAC	16	442
TA13755 (II.kısım)	" "	F;GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC TCGAGGTTCTGGACGTCCAATAC R;GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA AAAAGATACCTTTTCATTTCAGCAA	14	357
TA06510	" "	F;GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC GATATTGAGGAGGATCTACGTAGA R;GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA ACTTGATAATCTGTATGGGATTTT	34.6	804
TA11610	HSP70	F;GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC ACAGGACCAGCTATTGGAATTGAC R;GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA ATCCACCTCCTCTACAGTTGGGCC	71	1935
TA17315 (I.kısım)	Yüzey proteini (TaSP)	F;GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC GGTCCATTTCTTCTTTAGATCGAC R;GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA CCTTCGGGCGCTTATCATGATCGGA	19.1	516
TA17315 (II.kısım)	" "	F;GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC CCATGGCAATACGCTCTAACATTG R;GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA AGAGCTGGACCTGGCAGGGTGAGA	14.3	378
TA17315 (III.kısım)	" "	F;GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC CCATTCGTGCCCAAGACATCGCAAT R;GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA CTTGTCACATAACCACCAGTCAAA	6.3	162
TA15685	Hipotetikal protein (Ta9.1)	F;GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC ATGGATCCTGAAGATGGATCTGAG R;GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA TTATCTTGGTGTACTTGTACCCA	28	714
TA15690	" (Ta9.2)	F;GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC ATGGATCCTGATGGAGCTGAACCT R;GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA TCAAGAAAGTGCTTGTCTAATAAA	35.9	954
TA15695	" (Ta9.3)	F;GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC ATGGATCCTGATGGAGCTGATGG R;GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA CTAATTCTTCTTCCCATGGTTT	19	474
TA15705	Hipotetikal protein (Ta9)	F;GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC ATGGATTCTTCTGATTCTGATGAA R;GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA ATCCTTTTCTTCCCATGGTTTGGC	34.9	951
TA15710	" (Ta9.4)	F;GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC ATGGATCCTGATGGATCTGAACCT R;GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA TTATTGTTTTCTATATCACGTTT	37.9	1020

(<sup>a</sup>); dizilimin 5'- 3' yönü yazılıdır. İleri yönlü attB adaptörü; GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC-  
Geri yönlü attB adaptörü; GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA-

Elde edilen PZR ürünleri +4°C’de tutulmuştur. Daha sonra her PZR ürününden 25 µl olmak koşuluyla mililitresinde 10 µl ethidiyum bromid bulunan %1,5’lik agaroz jelde 100 voltluk akımda bir saat elektroforeze tabi tutulmuş ve son olarak ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir. Jel elektroforezi sonrası çoğaltılan ilgili gen bölgeleri (Çizelge 2.A.3) ultraviyole ışık altında görüntüledikten sonra bilinen uzunluktaki (bp) ürünler jelden kesilerek ayrılmış ve QIAGEN gel purifikasyon kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılarak purifiye edilmişlerdir. Bu amaç doğrultusunda jelden steril bistüri yardımıyla kesilerek alınan bantlar tartılarak ağırlıkları gram cinsinden belirlenmiş ve ağırlıklarının üç katı kadar QG solüsyonu eklenerek 50°C’de 10 dakika boyunca inkübe edilerek jelin erimesi sağlanmıştır. Daha sonra erimiş jeli içeren sıvı pipetle alınarak içinde jelden ayrılan DNA’nın bağlanmasını sağlayan kolonlar (QIAquick spin column) bulunan 2 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine konularak bir dakika boyunca santrifüj edilerek DNA’nın kolona bağlanması sağlanmıştır. Bunu takiben kolona bağlı DNA 500 µl QG solüsyonu eklenerek bir dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra 750 µl PE solüsyonu eklenerek iki kez bir dakika santrifüj edilmiştir. Son aşamada kolona bağlı DNA’nın elde edilebilmesi için 50 µl Elüsyon solüsyonu eklenerek bir dakika boyunca oda ısısında bekletilmiş ve bunu takiben kolon temiz 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne konulmuş ve bir dakika boyunca santrifüj edilerek purifiye edilen DNA’nın tüpe alınması sağlanmıştır. Tüpte toplanan PCR ürününün miktarının (ng / µl) belirlenmesi amacıyla 260/280 nm absorpsiyon aralığında spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. PCR ile çoğaltılan adaptörlü DNA ürünlerinin pDONR221 plazmid vektörlere BP rekombinasyon reaksiyonu ile klonlamada 100 femtomol (fmol) *attB*-PZR ürünü kullanılmıştır. Reaksiyonda nanogram (ng) cinsinden kullanılacak DNA miktarı aşağıdaki formül (Formül 1) kullanılarak hesaplanmıştır. Formül 1’de ‘N’ harfiyle belirtilen çoğaltılacak gen bölgesinin uzunluğunu belirtmektedir. Örnek olarak BP rekombinasyon reaksiyonunda (Şekil 2.A.1) 100 fmol *attB*-PZR ürünü kullanılmalıdır. PZR ile çoğaltılan gen bölgesinin uzunluğunda 2.5 kilobaz (kb) kabul edilirse reaksiyonda kullanılacak PZR ürünü miktarının aşağıdaki formül kullanılarak  $[(100 \text{ fmol}) \cdot (2500 \text{ bp}) \cdot (660 \text{ fg} / \text{fmol}) \cdot (1 \text{ ng} / 10^6 \text{ fg}) = 165 \text{ ng}]$  hesaplandığında 165 ng olduğu bulunmaktadır.

$$\text{Formül 1: } ng = (\text{fmol}) \cdot (N) \cdot (660 \text{ fg} / \text{fmol}) \cdot (1 \text{ ng} / 10^6 \text{ fg})$$

Yukarıdaki formül kullanılarak BP rekombinasyon reaksiyonunda kullanılacak DNA miktarları herbir gen bölgesi için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Daha sonra her gen bölgesine ait

*attB*-PZR ürünü sırayla ayrı donör vektörlere BP rekombinasyon reaksiyonu ile klonlanmıştır. Kısaca, 1,5 ml'lik santrifüj tüpü içerisine 100 fmol oranında (1-10 µl) *attB*-PZR ürünü, üzerinde kanamisin direnç geni bulunan pDONR221™ vektör (İnvitrogen) (2 µl), 5XBP Clonase™ tampon solüsyonu konularak 16 µl son hacime kadar TE solüsyonu, pH 8.0 eklenerek oda ısısında hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra –80°C'de bekletilen BP Clonase™ enzim karışımı buz üstünde yaklaşık iki dakika süreyle çözdürüldükten sonra iki defa kısa süreli vortekslenerek karıştırılmıştır. Herbir tüpe 4 µl BP Clonase™ enzim karışımı eklenerek karıştırılmış ve 25°C'de bir saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. BP rekombinasyon reaksiyonu ile *attB*-PZR ürünü plazmid vektör içerisine klonlanmıştır. Bir saat sonunda BP rekombinasyon reaksiyonu durdurulması amacıyla her bir reaksiyon tüpü içerisine 2 µl Proteinase K solüsyonu eklenerek 37°C'de bir saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon sonucunda içerisinde klonlanan *attB*-PZR ürününü içeren pDONR221™ vektör *E.coli* hücreleri içerisine kimyasal yolla transforme edilmiştir. Transformasyon işleminde, 1,5 ml'lik santrifüj tüpü içerisinde 50 µl kimyasal olarak yeterli hale getirilmiş DH5α™ (İnvitrogen) hücresi üstüne bir µl BP rekombinasyon ürünü eklenerek hafifçe karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bunu takiben hücreler 42°C'lik su banyosunda 30 saniye boyunca ısı şokuna tabi tutulduktan sonra tekrar buz üstüne alınmıştır. Isı şokuna tabi tutulan hücrelerin zengin bir medyum içerisinde hızlı bir şekilde üremesi amacıyla üzerine oda ısısındaki 450 µl S.O.C. medyumunu (%2 Tripton, %0.5 Maya Ekstarktı, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukoz) eklenerek 37°C'lik çalkalamalı inkübatör içinde 200 rpm de, bir saat boyunca tüpler yatay konumda olacak şekilde inkübe edilmiştir. Daha sonra önceden hazırlanan ve içerisinde 50 µg/ml kanamisin bulunan LB agar (LB agar; 1 litresinde 100 mg NaCl, %10 Tripton, %5 Maya ekstraktı, %10 agar bulunan solüsyon) üzerine 20 ve 50 µl olacak şekilde ekilerek gece boyu kolonilerin üremesi için 37°C'de bekletilmiştir. Ertesi gün üreyen kolonilerden seçilerek içerisinde 50 µg/ml kanamisin LB medyum (LB medyum; 1 litresinde 100 mg NaCl, %10 Triptone, %5 Maya ekstraktı bulunan solüsyon) içinde 37°C'de çalkalamalı inkübatörde bir gece çoğalmaya bırakılmıştır. Üreyen kolonilerden QIAGEN Plazmid DNA ekstraksiyon kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılarak içinde klonlanmış pDONR221™ plazmid vektörlerin pürifikasyonu yapılmıştır. Kısaca, 10 ml medyum +4°C'de, 8000 rpm' de üç dakika boyunca santrifüj edilerek *E.coli* hücreleri dipte toplanmıştır. Bu hücreler 250 µl P1 solüsyonu kullanarak tekrar sulandırılarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne konulmuştur. Bunun üstüne 250 µl P2 solüsyonu eklenerek iyice karışması sağlanmış ve 350 µl N3 solüsyonu eklenerek iyice karıştırılarak 13000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj işleminden

sonra üstte kalan kısım dikkatlice alınarak QIAprep spin kolonları içerisine konularak 30–60 saniye boyunca santrifüj edilmiş ve dipte toplanan sıvı dökülerek kolona 0.5 ml PB solüsyonu eklenmiş ve 30–60 saniye santrifüj edilerek yıkanması sağlanmıştır. Daha sonra 0.75 ml PE solüsyonu eklenip 30–60 saniye santrifüj edilerek bir kez daha yıkanmıştır. Dipte toplanan sıvı döküldükten sonra kolonda kalmış olan tüm yıkama solüsyonunun giderilmesi için santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Son aşamada kolona bağlı DNA'nın elde edilmesi için 50 µl Elüsyon solüsyonu eklenerek bir dakika boyunca oda ısısında bekletilmiş ve kolon temiz 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne konulup bir dakika boyunca santrifüj edilerek DNA'nın tüpe elüsyonu sağlanmıştır. Elde edilen plazmid DNA miktarı spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. 1 µg pürifiye plazmid DNA'sı restriksiyon enzimleri ile kesilerek agaroz jelde (%1,5) 100 voltluk akımda bir saat boyunca elektroforeze tabi tutulmuş ve kesilen ürünlerin uzunluklarına bakılarak ilgili gen bölgesinin vektör içerisine klonlanıp klonlanmadığı doğrulanmıştır.

Pürifiye haldeki pDONR221™ plazmid vektör içerisinde oluşturulan giriş klonu oluşturulduktan ilgili gen bölgesi *attR*- içeren hedef vektör (pDEST17™, İnvitrogen) içerisine klonlanarak *attB*- ihtiva eden sentez klonu oluşturulmuştur. Sentez klonu oluşturmak amacıyla uygun *attL*- ve *attR*- ihtiva eden hedef vektör (pDEST17™, İnvitrogen) kullanılarak LR rekombinasyon reaksiyonu (Şekil 2.A.1) gerçekleştirilmiştir. LR rekombinasyon reaksiyonu 1,5 ml'lik santrifüj tüpü içerisine herbir reaksiyonda 100–300 ng miktarında (1-10 µl) giriş klonu, üzerinde ampisilin direnç geni bulunan pDEST17™ hedef vektörü (İnvitrogen) (2 µl), 5XLR Clonase™ tampon solüsyonu konularak 16 µl son hacime kadar TE solüsyonu (pH 8.0) eklenerek oda ısısında hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra –80°C'de bekletilen LR Clonase™ enzim karışımı buz üstünde yaklaşık iki dakika süreyle çözdürülmüş ve iki defa kısa süreli vorteksenerek karıştırılmıştır. Her tüpe 4 µl LR Clonase™ enzim karışımı eklenerek karıştırılmış ve 25°C'de bir saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. LR rekombinasyon reaksiyonu giriş klonu içerisindeki gen bölgesi hedef vektördeki ilgili bölgesine *attB*- yardımı ile klonlanmıştır. Bir saat sonunda LR rekombinasyon reaksiyonu durdurulması amacıyla her tüpü içerisine 2 µl Proteinase K solüsyonu eklenerek 37°C'de on dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon sonucunda klonlanan plazmid *E.coli* hücrelerine (DH5α) transforme edilmiş ve ilgili gen bölgesi QIAGEN Plazmid DNA ekstraksiyon kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılarak pürifiye edilmiştir. Pürifiye plazmid DNA'nın 1 µg'ı ilgili restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jelde 100 volt akımda bir saat boyunca elektroforeze tabi tutulmuş ve kesilen ürünlerin uzunluklarına (bp) bakılarak istenilen gen bölgesinin vektör içerisine klonlanıp klonlanmadığı doğrulandıktan sonra plazmid DNA örnekleri (1–2 µg) 37 °C'de bir

gece boyunca kapakları açık olarak bekletilerek DNA'nın kuruması sağlanmış ve bu örnekler sekans analizlerinin yapılması için ticari bir şirkete gönderilmiştir (MWG Biotech, Almanya). Dizilim analizleri *T. annulata* genomundaki aynı gen bölgesi ile Clustal X bilgisayar programı ile benzerlikleri yönünden incelenmiştir. Dizilim sonuçları aynı plazmidlerin ilgili proteinleri sentez edebilmeleri için transforme edildikleri DH5 $\alpha$  hücreleri içerisinde QIAGEN Plazmid DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak pürifiye edilerek ilgili proteinlerin sentezine olanak veren BL21–A1 hücreleri içerisinde transforme edilmişlerdir. BL21–A1 hücreleri içerisinde bulunan ve sentezlenmesinin istendiği proteinleri kodlayan gen bölgelerini içeren plazmid vektörleri (sentez klonu) içeren koloniler kullanılarak proteinler aşağıda anlatıldığı şekilde elde edilmiştir.

#### **2.2.1.4. Klonlanan Gen Bölgelerince Kodlanan Proteinlerin Üretilerek**

##### **Saflaştırılması**

Klonlanan gen bölgelerince kodlanan proteinlerin üretilerek saflaştırılması için *lon* ile OmpT proteazı ihtiva etmeyen bir *E.coli* suşu olan BL21–A1 kullanılmıştır. BL21–A1 hücrelerinde bahsedilen bu iki proteazın olmayışı heterolog proteinlerin sentezi için uygun bir suş haline getirmektedir. *E.coli*'nin bu suşa ait kromozoma ait *araB* lokusunda *araBAD* operonunda yer alan T7 RNA polimeraz (T7 RNAP) geni bulunmaktadır. Bu gen bölgesi yardımı ile T7 RNA polimeraz sentezi L–arabinoz ve glikoz gibi şekerler ile regüle edilebilmektedir. Aynı zamanda BL21–A1 suşu T7 bazlı sentez vektörlerden yüksek miktarlarda rekombinant protein sentez edilebilmesine olanak sağlamaktadır. QIAGEN Plazmid DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak pürifiye edilen plazmid (pDEST17<sup>TM</sup>) DNA miktarı spektrofotometrede okunarak belirlenmiştir. Her transformasyon reaksiyonu için bir tüp BL21–A1 hücresi kullanılmıştır. Buz üzerinde çözdürülen hücrelerin üzerine 5–10 ng plazmid DNA'sı eklenerek pipetleme yapmadan elle hafifçe vurularak karıştırılıp buz üzerinde 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Bunu takiben hücreler 42°C'lik su banyosunda 30 saniye boyunca ısı şokuna tabi tutulduktan sonra hızlı bir şekilde tekrar buz üstüne alınmıştır. Isı şokuna tabi tutulan hücrelerin üzerine oda ısısındaki 250  $\mu$ l oda ısındaki S.O.C. medyumunu (%2 Tripton, %0.5 Maya Ekstarktı, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukoz) eklenerek 37°C'lik çalkalamalı inkübatör içinde 200 rpm'de, bir saat boyunca tüpler yatay konumda olacak şekilde inkübe eklenmiştir. Daha sonra içerisinde 100  $\mu$ g/ml ampisilin bulunan LB agar (LB agar; 1 litresinde 100 mg NaCl, %10 Triptone, %5 Maya ekstraktı, %10 agar bulunan solüsyon) üzerine 20 ve 200  $\mu$ l olacak şekilde ekilerek gece boyu kolonilerin üremesi için 37°C'de bekletilmiştir. Üreyen koloniler seçilerek

içerisinde 100 µg/ml ampisilin LB medyum (LB medyum; 1 litresinde 100 mg NaCl, %10 Triptone, %5 maya ekstraktı bulunan solüsyon) içinde 37°C’de çalkalamalı inkübatörde bir gece çoğalmaya bırakılmıştır. Medyum içinde üreyen kolonilerden QIAGEN Plazmid DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak purifiye edilen plazmidler restriksiyon enzimi kullanılarak kesilmiş ve içerisinde ilgili gen bölgesini ihtiva eden koloniler belirlenerek %50 gliserol ile yarı yarıya sulandırılarak -80°C’de muhafaza edilmiştir. Daha sonra rekombinant proteinlerin üretilmesi amacıyla -80°C’de saklanan gliserol stokları buz üzerine alınarak belli süre oda ısısında çözülmeye bırakıldıktan sonra ateşten geçirilmiş steril öze yardımı ile 20 ml LB medyum (içerisinde 100 mg/ml ampisilin ihtiva eden) içerisine ekilip 37°C’lik çalkalamalı inkübatör içinde 200 rpm’de, gece boyunca tüpler dikey konumda olacak şekilde inkübe edilmiştir. Üreyen hücrelerin miktarları spektrofotometrede OD<sub>600</sub>’de okunmuş ve değerleri 0.6–1.0 olanlar kullanılmıştır. Üretilen koloniler 1:20 oranında dilüye edilecek şekilde içerisinde 100 mg/ml ampisilin bulunan 200 ml’lik LB medyum içerisine konularak hücreler mid–logaritmik faza (OD<sub>600</sub> = ≈ 0.4 yada 2–3 saat boyunca) ulaşmaya kadar çalkalamalı etüvde 200 rpm’de üretilmiş ve orta fazdaki hücrelere son konsantrasyonu %0.2 olacak şekilde L–arabinoz eklenerek hücrelerde rekombinant proteinlerin sentezi indüklenerek hücreler 2–4 saat daha çalkalamalı etüvde inkübe edilmişlerdir. Süre sonunda hücreler 14000 rpm’de 15 dakika, +4°C’de santrifüj edilerek toplanmış ve rekombinant proteinleri ihtive eden hücreler kullanılmaya kadar -20°C’de saklanmıştır. Daha sonra -20°C’den alınan hücreler buz üzerinde çözdürülmüş ve üzerine 8 ml, ısısı equilibre edilerek 37°C’ye getirilen GuHCl çökücü solüsyonu (0.58 ml stok solüsyon A + 9.42 ml stok solüsyon B + 57.3 g guanidin hidroklorid eklenerek son hacim deionize su ile 100 ml’ye tamamlanarak pH 7.8’e ayarlanmıştır) ile tekrar süspansiyon edildikten sonra 10 dakika boyunca oda ısısında çalkalamalı rotorda hücrelerin yüzeyleri lize edilmiş ve aynı zamanda rekombinant proteinleri degrade edebilecek proteaz gibi enzimler denature hale getirilmiştir. Bunu takiben hücreler buz üzerine konularak sonikatörde üç kez her siklus beş saniye olacak şekilde sonike edilerek parçalanmaları ve üretilen rekombinant proteinleri açığa çıkması sağlanmıştır. Sonikasyon işleminden sonra karışım 10000 rpm’de, 15 dakika, + 4°C’de santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı temiz bir tüpe konularak buz üzerinde bekletilmiştir. Bu esnada 6xHis ile işaretli (His-tag) proteinlerin purifikasyonu için histidinleri bağlama yeteneği olan Ni–agaroz taneleri içeren solüsyondan iki ml alınarak 10 ml’lik kolonlar içerisine konularak tanelerin oda ısısında dipte toplanmaları beklenmiş ve sonra üstteki sıvı aspire edilmiştir. Taneler bir kez deionize su, iki kezde bağlanma solüsyonu (0.58 ml stok solüsyon A + 9.42 ml stok solüsyon B + 48.1 g üre eklenerek son hacim deionize su ile 100 ml’ye tamamlanmıştır, pH 7.8) ile yıkanmıştır. Bu



işlem tamamlandıktan sonra buz üzerinde bekletilen sıvı içerisinde equilibre edilmiş Ni-agaroz taneleri bulunan kolonlar içerisine konarak histidin işaretli rekombinant proteinleri agaroz tanelere bağlanmaları için 30 dakika boyunca oda ısısında çalkalamalı rotorda yavaşça çalkalanarak inkübe edilmişlerdir. Çalkalama işlemi tamamlandıktan sonra kolonlar dik konuma getirilerek rekombinant proteinleri bağlamış olan tanelerin dibine çökmeleri sağlanmış ve üstte kalan sıvı aspire edilip dışarı atılmıştır. Daha sonra dipteki taneler sırası ile ikişer kez, pH değerleri kademeli olarak azalan, dörder ml bağlanma solüsyonu (pH 7.8), yıkama solüsyonu (7.38 ml stok solüsyon A + 2.62 ml stok solüsyon B + 48.1 g üre eklenerek son hacim deionize su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır, pH 6.0) ve yıkama solüsyonu (pH 5.3) ile yıkanarak Ni-agaroz taneler üzerine bağlanabilecek istenmeyen proteinler elimine edilmiştir. Yıkama işleminden sonra, 6xHistidin işaretli rekombinant proteinlerin elüye etmek amacıyla kolon düşük pH'ya sahip 5 ml elüsyon solüsyonu (10 ml stok solüsyon A + 48.1 g üre eklenerek son hacim deionize su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır, pH 4.0) ile agarozdan ayrılarak alttaki tüplerde saf olarak toplanmıştır ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

#### **2.2.1.5. Proteinlerin SDS Polyakrilamid Gel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot**

*Theileria annulata*'nın farklı izolatlarına ait hücre kültürlerinden hazırlanan protein ekstraktlarında immunodominant bantların belirlenerek izole edilmesi ve aynı zamanda klonlanarak rekombinant olarak üretilen proteinlere (Çizelge 2.A.3) karşı sporozoitler ve yüksek pasajlı hücre kültürleri ile enfekte edilen hayvanlardan birincil (primer) enfeksiyon esnasında ve *T. annulata* Gharb suşundan hazırlanan sporozoit stabilatı ile oluşturulan re enfeksiyonu takiben toplanan serum örneklerindeki bağışık yanıt western blotlama yöntemi ile incelenmiştir. Daha sonra elde edilen sonuçlar her protein için ayrı ayrı değerlendirilerek en yüksek düzeyde humoral bağışık yanıt oluşturan protein seçilerek epidemiyolojik çalışmalarda denenmek üzere indirek ELISA yönteminin geliştirilmesinde kullanılması amacıyla kullanılmıştır. Western blotlamada, sporozoitler ve yüksek pasaj hücre kültürleri ile enfekte hayvanlardan toplanan enfeksiyon öncesi sıfırinci gün, enfeksiyon sonrası 35-85-140. gün serumları ile *T. annulata* Gharb suşundan hazırlanan sporozoit stabilatı ile oluşturulan re enfeksiyon sonrası 7-28 ve 42. gün serumları ayrı ayrı denenmiştir.

Bu amaçla proteinlerin jel üzerinde moleküler ağırlıkları göre büyükten küçüğe doğru dizilmeleri için ilk olarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli (1970), tarafından belirtilen yöntemine göre Biorad Protean II ve mini Protean II gel

elektroforez sistemleri kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan poliakrilamid gel proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre dikey olarak ayrıldığı ayrışma jeli (resolving gel) ve boşluklara yüklenen proteinlerin ayrışma geline gelmeden önce aynı hizada birarada tutulmasını sağlayan istifleyici jel (stacking gel) olmak üzere iki farklı poliakrilamid konsantrasyonunda jelden oluşmaktadır. Mini Protean II sisteminde %12 poliakrilamid konsantrasyondaki 5 ml ayrışma jeli kullanılmıştır. Ayrışma jelinin hazırlanmasında; 1.6 ml dH<sub>2</sub>O, 2 ml akrilamid karışımı (%30 acrylamide, 0.8 N-N Bis-methylene acrylamide, Sigma), 1.3 ml 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 ve 50 µl %10 SDS karışımının üzerine sırasıyla 50 µl taze hazırlanmış %10 amonyum persulfat (APS, Sigma) ve 2 µl tetra-metil-1,2-diaminoethan (TEMED, Sigma) eklenerek jel oda ısısında 30 dakika boyunca polimerizasyonun oluşması için bekletilmiştir. Polimerize olan ayrışma jelinin üzerine 2 ml %5 konsantrasyonda istifleyici jel (1.4 ml dH<sub>2</sub>O, 0.33 ml %30 akrilamid karışımı, 0.25 ml 1M Tris-HCl, pH 6.8, 20 µl %10 SDS, 20 µl taze hazırlanmış %10 amonyum persulfate ve 2 µl tetra-metil-1,2-diaminoethan) konulduktan sonra proteinlerin yükleneceği boşlukları oluşturmak için bu jelin içine 10 gözlü tarak konularak jel polimerize olamaya bırakılmıştır.

Jelin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra ilk göze 20 µl 29-205 kDa aralığında Biorad (Sigma) yada 6–175 kDa aralığında BioLab (New England Lab.) protein moleküler işaretleyici konulmuştur. Diğer gözlerde *T. annulata*'nın farklı izolatları ile enfekte hücre kültürlerinden hazırlanan protein ekstraktları ile enfekte olmayan sığır lenfosarkom (BL20), *T. parva* ile *T. lestoquardi* hücre kültürlerinden hazırlanan protein ekstraktlarından her göze ayrı ayrı gelecek şekilde eşit konsantrasyonlarda konulmuştur. Yine klonlanan rekombinat proteinlere karşı oluşan bağışık yanıtın incelenmesi amacıyla yukarıda anlatıldığı şekilde gözlerle konulmuştur.

Proteinler elektroforez solüsyonu içerisinde (50 mM Tris, 384 mM glycine, 2 mM EDTA ve %0.1 SDS) 100 voltluk akımda iki saat boyunca elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforez sonrasında proteinler western blotlama yöntemi kullanılarak (Towbin ve ark, 1990) nitrocelluloz membrana (Hybond C, Amersham yada Whatmann) transfer solüsyonu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %20 methanol) içinde Bio-Rad Trans blot sistemi kullanılarak 300 mA akım altında bir saat boyunca aktarılmışlardır. Membrana transfer edilen proteinlerin belirlenmesi amacıyla membran bir kezlik Panceau-S (Sigma) solüsyonu ile beş dakika boyandıktan sonra distile su ile yıkanarak protein bantları görüntülenerek protein transferinin etkinliği kontrol edilmiştir. Bunu takiben membran Tris-saline yıkama solüsyonu (10 mM Tris.HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, %0.1 Tween 20) ile birkez yıkanmıştır. Özgül olmayan

bağlanmaların önlenmesi amacıyla membran, bloklama solüsyonu (%5 yağsız süt tozu içeren Tris-saline solüsyonu) ile bir saat boyunca oda ısısında çalkalama platformu üzerinde hafifçe çalkalanarak inkübe edilmiştir. Bloklama işlemini takiben, membran 1: 500–1: 800 oranında dilüye edilmiş sığır serumu ile iki saat (oda ısısında) yada gece boyunca (soğuk odada +4°C’de) inkübe edilmiştir. Bunu takiben membran bağlanmamış antikörlerin uzaklaştırılması amacıyla Tris–saline yıkama solüsyonu ile çalkalama platformu üzerinde üç kez her yıkama beşer dakika olacak şekilde yıkanmıştır. Yıkama işlemini takiben membran 1:20000 oranında bloklama solüsyonu içinde dilüye edilmiş alkalen fosfataz ile işaretli ikincil anti – sığır Ig G serumu (Sigma) ile oda ısısında bir saat boyunca inkübe edilmiştir. İkincil antikör ile inkübasyondan sonra membran Tris–saline yıkama solüsyonu ile çalkalama platformu üzerinde üç kez her yıkama beşer dakika olacak şekilde yıkanmıştır. Oluşan antijen–antikör reaksiyonu 5-bromo-4-kloro-3-indolin-fosfat (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma) ile beş ila yedi dakika boyunca inkübe edilerek belirlenmiştir. Reaksiyon membranın çeşme suyu altında yıkanması ile durdurulmuş ve membran üzerinde oluşan bantlar, bunların moleküler ağırlıkları ve yoğunlukları incelenmiştir.

#### **2.2.1.6. D7 Hücre Kültürlerinin Alt Hücresel Fraksiyonlarına Ayrılması**

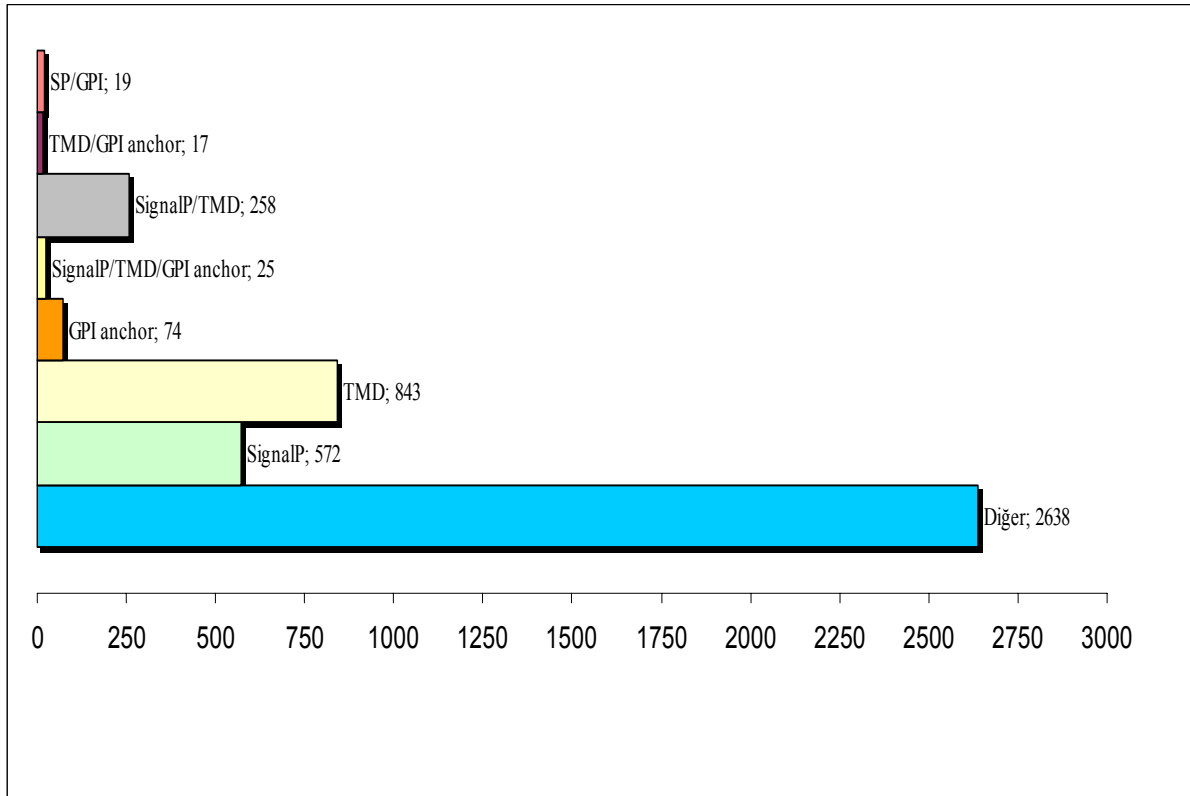
Makroşizontlarla enfekte klonal D7 doku kültürü hücrelerinde western blotlarda görülen immunodominant proteinlerin hücresel fraksiyonlardaki dağılımının belirlenmesi amacıyla kültürler Proteoextract® Subcellular Proteome Extraction Kiti (Clabiochem, İngiltere) kullanılarak alt hücresel fraksiyonlarına ayrıldıktan sonra sporozoit ile enfekte hayvana ait RES 42. gün serumu kullanılarak western blotlama ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla mililitresinde  $3-5 \times 10^6$  hücre bulunan kültürler 14 ml’lik tüplere konularak 1500 devirde, beş dakika boyunca +4°C’de santrifüj edilerek dipte toplanmış ve üst kısım dökülerek uzaklaştırılmıştır. Dipteki hücreler iki mL soğuk yıkama solüsyonu ile tekrar süspanse edilerek +4°C’ de nazikçe çalkalanarak beş dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 100–300xg’de 10 dakika boyunca, +4°C’de santrifüj edilerek hücreler tekrar dipte toplanmış ve üst kısım aspire edilerek atılmıştır. Bu işlem iki kez tekrar edilmiştir. Daha sonra içerisine 5µl proteaz İnhibitör Kokteyli eklenerek hazırlanan 1ml, soğuk ekstraksiyon solüsyonu I dipteki hücrelere eklenmiş ve nazikçe karıştırılarak hücrelerin süspanse olması sağlandıktan sonra +4°C’de nazikçe çalkalanarak 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Bu işlemden sonra 500–1000xg’de 10 dakika boyunca, +4°C’de santrifüj edilerek hücreler tekrar dipte toplanmış ve üst kısım (birinci fraksiyon; sitoplazmik proteinler) aspire edilerek temiz bir tüpe aktarılarak buz üstünde bekletilmiştir. Daha sonra içerisine 5µl proteaz İnhibitör Kokteyli

eklenerek hazırlanan 1ml, soğuk ekstraksiyon solüsyonu II dipteki hücrelere eklenerek nazıkçe karıştırılmış ve +4°C’de nazıkçe çalkalanarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonra 5000–6000xg’de 10 dakika boyunca, +4°C’de santrifüj edilerek hücreler tekrar dipte toplanmış ve üst kısım (ikinci fraksiyon; membran ve mebran organelleri) aspire edilerek temiz bir tüpe aktarılarak buz üstünde bekletilmiştir. Bu işlemi takiben dipteki pellet üzerine, içerisine 5µl proteaz İnhibitör Kokteyli ve 1.5µl ( $\geq 375$  U) Benzonase® nuclease bulunan 1ml, soğuk ekstraksiyon solüsyonu III eklenerek pipete edilmiş ve +4°C’ de hafifçe çalkalanarak 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra karışım 6800xg’de 10 dakika boyunca, +4°C’de santrifüj edilmiş ve üst kısım (üçüncü fraksiyon; nükleik asitler) aspire edilerek temiz bir tüpe aktarılarak buz üstünde bekletilmiştir. Daha sonra dipteki çökelti, içerisine 5µl proteaz İnhibitör Kokteyli eklenerek hazırlanan 500µl, oda ısısındaki ekstraksiyon solüsyonu IV süspanse hale getirilip (dördüncü fraksiyon; sitoskeletal organeller) buz üzerine aktarılmıştır. Hazırlanan fraksiyonlar (I, II, III ve IV) yukarıda belirtilen serum (RES 42. gün) kullanılarak western blotlama ile değerlendirilerek bantların alt hücresel dağılımı incelenmiştir.

## 2.A.2. Bulgular

### 2.A.2.1. Biyoinformatik Yöntemle Belirlenen *T. annulata*'nın Makroşizont Dönemine Özgü Proteinler

*Theileria annulata* genomunda protein kodlayan genler içerisinde parazit in makroşizont dönemine özgü olan ve konak vücudunda humoral düzeyde cevap oluşturabilecek proteinlerin belirlenmesi amacıyla biyoinformatik yöntemler kullanılarak yapılan analizler sonucunda parazitin farklı yaşam dönemlerinde değişen miktarlarda sentezlenen toplam 3783 genin 572 tanesinin signal peptid içeren gen, 843 tanesinin her gen üzerinde farklı sayılarda (1–24) olmak kaydıyla transmembran alan ihtiva eden ve 73 tanesinde GPI anchor içeren gen olduğu belirlenmiş ve bu genlerin grafiksel dağılımı Şekil 2.A.2'de gösterilmiştir. GPI anchor içeren 73 genden 17 tanesi GPI bağlayıcı ile TMD, 44 tanesinde GPI bağlayıcı ve SP ihtiva etmektedir. Geri kalan 12 genin ise sadece GPI bağlayıcı içerdiği belirlenmiştir. GPI motifi içerip, SP dizilimi bulunmayan gen bölgelerinde ya hatalı GPI belirlenmiş yada signal dizilim SignalP2.0 bilgisayar programı tarafından belirlenememiştir. Signal peptid içeren 572 ve TMD içeren 843 genden 270 tanesi sadece SP ve 560 tanesi sadece TMD içerirken, 19 gen SP+GPI anchor, 258 gen SP+TMD ve 25 gende SP+TMD+GPI anchor içerdiği belirlenmiştir.



**Şekil 2.A.2.** *Theileria annulata* genomunda kodlanan proteinlerden Signal peptid, GPI anchor ve/veya transmembran alan ihtiva eden peptidlerin grafiksel dağılımı.

Excel formatında bir araya toplanan genler, SP+GPI bağlayıcı içerenlerden başlanarak EST verilerine göre yukarıdan aşağıya doğru sıralanmış ve genler içerisinden parazitin makroşizont dönemine özgü olanlar ayrı bir excel sayfasında toplanarak EST verileri ve dN/dS oranlarına göre tekrar yukarıdan aşağıya doğru sıralanmıştır. Sıralanan 113 gen arasından dört ve daha fazla TMD içerenler, signal motifi bulunduğu halde hiçbir transmembran alan ve GPI motifi bulunmayanlar ile düşük dN/dS oranına ( $\leq 0.1$ ) sahip olanlar (HSP70 hariç) çıkartılmış ve kalan gen bölgeleri Çizelge 2.A.4’da gösterilmiştir. En üstte yer alan TA08425 (Tamr) rhoptri antijeni olup yapılan çalışmalar ile bu antijene karşı gelişen humoral yanıt incelenmiştir (İlhan 1999). İki, altı, yedi, sekiz ve dokuzuncu sıradaki proteinler aranan özelliklere sahip proteinlerdir. Ancak bunlardan dokuzuncu sırada yer alan TA15040 proteini üzerinde yer alan 5 adet intron proteinin uygun biçimde klonlanabilmesine olanak vermemiştir. Geriye kalan sırasıyla TA06510, TA20440, TA13755, TA17315 (TaSP) proteinleri ile parazitin makroşizont, merozoit/piroplasm dönemlerinde görülen 70 kDa ağırlıkdaki ısı şok proteinide (HSP70) klonlanarak rekombinant olarak üretilmiştir. Biyoinformatik yolla belirlenen proteinlerden biri olan TA20980 (*T. lestoquardi* benzeri

protein) proteini daha önceki çalışmalarda iyi sonuç vermediği (İlhan 1999) için klonlanmamıştır. Dört ve beşinci sıradaki TA07565 ve TA12850 proteinlerinin sahip oldukları sırasıyla 9.3 ve 8 kDa'luk moleküler ağırlıklarının çok küçük oluşu ve diğer proteinlerle karşılaştırıldığında daha düşük dN/dS oranına sahip olmaları sebebiyle bu proteinlerde klonlanmamışlardır.

Değerlendirilen proteinlerden sadece TaSP molekülünde PEST motifine rastlanırken, diğer proteinlerde hızlı protein degradasyonu için signal peptid görevini gören bu motiflere rastlanmamıştır. Yapılan incelemelerde TA15040, TA12850 proteinlerinde bir tane, Tams-1'de ise iki tane fonksiyonları tam olarak bilinmeyen ve 'FAINT domain' olarak adlandırılan alanlar bulunmuştur. Bunun yanında rekombinant olarak üretilen TA06510, TA20440, TA13755, TaSP, Tams-1 ve Mero I polipeptidlerinde de birer adet FAINT domain belirlenmiştir.

Çizelge 2.A.4'de belirtilen proteinlerinden TA06510, HSP70, TA15685, TA15690, TA15695, TA15705 ve TA15710 proteinlerinin SP kısımları haricinde kalan kısımları başarıyla klonlanarak rekombinant olarak üretilmişlerdir. Bunun yanında birleştirilmemiş kodlayan bölgesinde iki intron içeren TaSP molekülünün konak hücre stoplazması ile ilişkide olan polimorfik merkezi bölgesi (I.kısım) tarafından kodlanan protein başarıyla üretilmişken, iki intron arasında kalan 100 bp'lık bölge ile konak hücre sitoplazmasına doğru yönelmiş C terminal kısmı tarafından kodlanan proteinler rekombinant olarak üretilenmemiştir. Bunun yanında üç transmembran alan, SP ve bir intron içeren TA13755 geni tarafından kodlanan proteine ait ikinci ekson tarafından kodlanan ve TMD'lerin haricindeki N ve C terminale yakın polipeptidlerden her ikiside rekombinant olarak üretilenmiştir. Ancak SP, üç TMD, GPI anchor ve iki intron içeren TA20440 genine ait ikinci ekson tarafından kodlanan polipeptidlerden sadece iki TMD arasında kalan nükleotidler tarafından kodlanan peptidler klonlanarak üretilenmiştir.

Tams-1/2, Mero I, TashHN, RP2/4, TA06470 ve TA10720 gen bölgeleri tarafından kodlanan proteinler daha önceden Glasgow Üniversitesi Enfeksiyon ve İmmünite Anabilim dalın Parazitoloji Bölümünde klonlanmış hali hazırda mevcut olan gliserol stoklarından üretilerek saflaştırılmıştır.

**Çizelge 2.A.4.** Biyoinformatik yolla SP, TMD, GPI anchor, EST verileri ve dN/dS oranlarına göre belirlenen proteinler

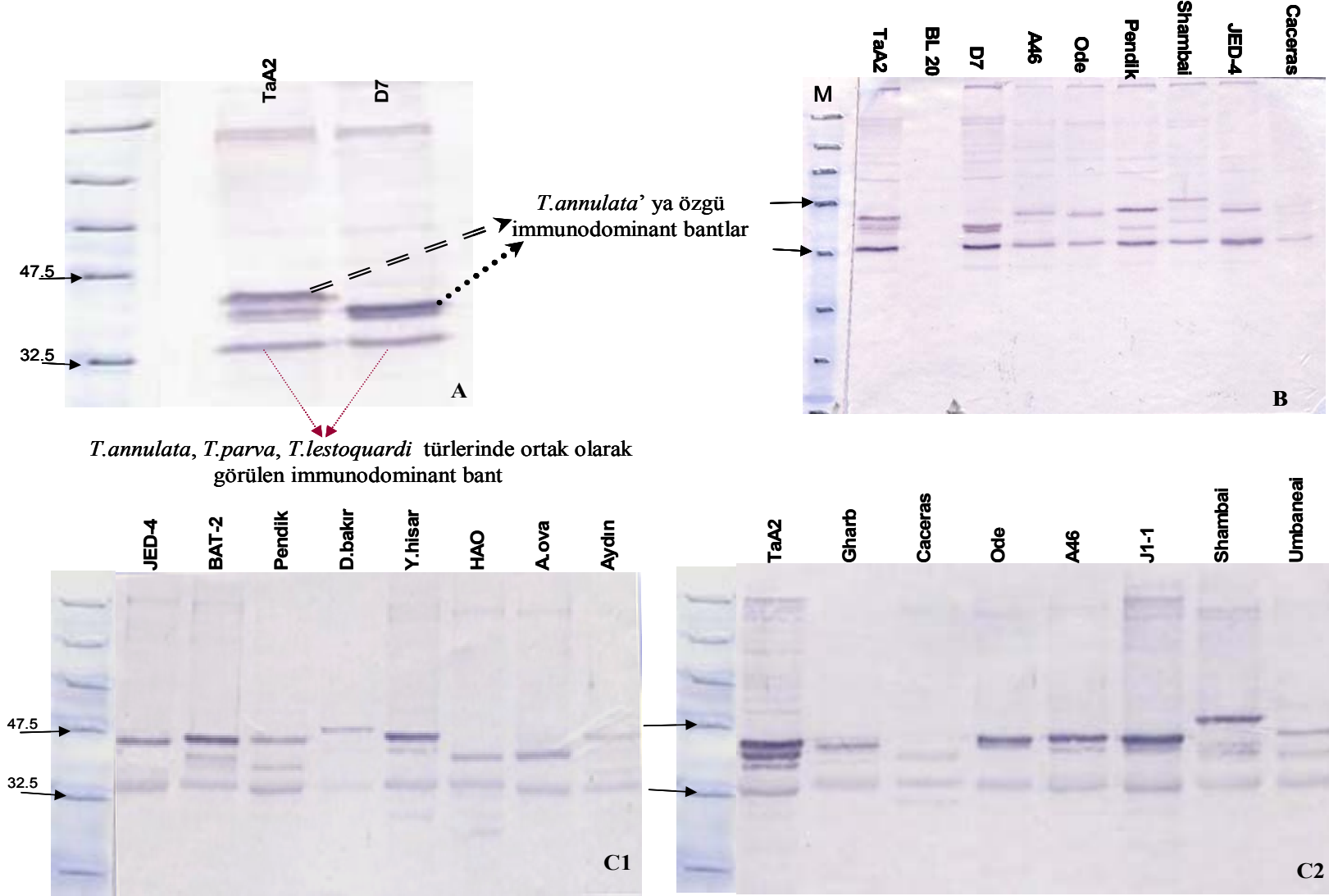
<i>T. annulata</i> ismi	<i>T. parva</i> No	Macro.	Mero.	Piro.	Ürün	SignalP	TMD	GPI bağlayıcısı	Çekirdekte yerleşme	Macro. EST verisi	Mero. EST verisi	Piro. EST verisi	dN/dS oranı	PEST motifi	Moekiller Ağırlık (kDa)	FAINT domain
TA08425 <sup>b</sup>	TP04_0437	1	1	0	<i>T. parva</i> micronem-rhoptri antijeni	√	1	√	1	1	2	0	0,2931	-	105	2
TA06510* <sup>c</sup>	TP01_0939	1	0	0	Hipotetikal protein	√	1	√	0	11	0	0	0,1633	-	36.9	1
TA16680	TP01_1165	1	0	1	ATP-bağımlı RNA helikaz	√	0	√	0	2	0	2	0,1353	-	93.2	-
TA07565	TP04_0076	1	0	0	Korunmuş hipotetikal protein	√	1	√	0	9	0	0	0,133	-	9.3	-
TA12850		1	0	0	Korunmuş hipotetikal protein	√	2	√	0	3	0	0		-	8	1
TA20440 (TaSPbenzeri)* <sup>c</sup>	TP01_0522	1	1	0	Hipotetikal membran proteini	√	3	-	0	2	6	0	0,4003	-	28	1
TA13755 (TaSPbenzeri)* <sup>c</sup>	TP02_0543	1	1	0	Hipotetikal protein	√	3	-	0	6	2	0	0,3236	-	53.4	1
TA17315 (TaSP)* <sup>b,c</sup>	TP04_0051	1	1	0	Yüzey proteini	√	3	-	0	11	7	0	0,2425	1	35.4	1
TA15040	TP02_0777	1	0	0	Korunmuş hipotetikal protein	√	3	-	0	20	0	0	0,2127	-	25.5	1
TA20980 (NC1) <sup>b</sup>	TP01_0380	1	1	0	Prolinden zengin protein ( <i>T. lestoquardi</i> benzeri protein)	1	1	0	√	0	-	1	0,1573	-	111	-
TA11610 (HSP70)*	TP02_0148	1	1	1	Isı şok proteini ,70 kDa	√	0	-	1	13	31	25	0,0119	-	70	-
TA17050 (Tams-1)* <sup>a,b</sup>	TP01_1056	0	1	1	Merozoit / piroplasm yüzey antijeni	√	1	√	0	0	10	12	0,2751	-	32.3	1
TA13810 (MeroI)* <sup>a</sup>	TP02_0551	0	1	1	ts-chitose tip, 23 kDa piroplasm yüzey proteini benzeri	√	1	√	0	0	9	2	0,1638	-	26.8	1
TA10720* <sup>a</sup>	TP04_0646	0	1	1	Isı şok proteini (HSP90 homoloğu)	√	1	-	0	0	2	1	0,07	-	104.2	-
TA06470* <sup>a</sup>	TP01_0934	1	1	1	HSP90 homoloğu şaperon proteini	√	0	-	1	0	1	7	0,0416	1	115.6	-

(\*); bu çalışmada kullanılan rekombinant proteinleri belirtmektedir. (<sup>a</sup>); mevcut gliserol stoklarından üretilerek saflaştırılan proteinleri belirtmektedir. (<sup>b</sup>); daha önceki çalışmalarda kullanılmış olan proteinleri belirtmektedir. (<sup>c</sup>); bu çalışmada biyoinformatik yolla belirlenerek klonlanan proteinleri belirtmektedir.



## 2.A.2.2. Rekombinant Proteinler ve *T. annulata*'nın Farklı İzolatları ile Elde Edilen Western Blot Sonuçları

*Theileria annulata*'nın farklı izolatlarına ait hücre kültürlerinden hazırlanan protein ekstraktlarında immunodominant bantların belirlenerek izole edilmesi amacıyla *T. annulata* Ankara sporozoit stabilatı ile enfekte hayvanlarda, *T. annulata* Gharb sporozoit stabilatı ile oluşturulan re enfeksiyonu takiben (RES) 42. günde alınan serum örneği kullanılarak yapılan western blotlama sonuçları Resim 2.A.1'de gösterilmiştir. Western blot analizlerinde klonlanmamış TaA2 ve klonal D7 hücrelerinden hazırlanan protein ekstraktlarında 42. gün serumu sırasıyla dört ve üç adet dominant bant belirlenmiştir. Bu bantlardan yaklaşık 32.5–35 kDa arasında ağırlığa sahip olan bant (Resim 2.A.1, A, parçalı, kırmızı ok) *T. parva* ve *T. lestoquardi* türleride dahil olmak üzere tüm *T. annulata* izolatlarında görülen, aynı moleküler ağırlıktaki ortak bant olmuştur. Bununla birlikte yaklaşık 36–45 kDa arasında olan *T.annulata* Ankara izolatlarının klonal olmayan TaA2 hücre kültüründen hazırlanan protein ekstraktlarındaki üç ve klonal D7 hücre kültüründen hazırlanan protein ekstraktlarındaki iki dominant bant ise *T. annulata* türene özgü olarak görülen bant (Resim 2.A.1. A, çift çizgili ve noktalı, siyah oklar) olmuştur. Yaklaşık  $\approx 36\text{--}45$  kDa arasında moleküler ağırlığa sahip dominant bantlar *T. annulata*'nın farklı izolatları arasında boyut olarak polimorfizm göstermiştir (Resim 2.A.1, B). Özellikle, *T. annulata*'nın Sudan izolatları olan Shambai ve Umbaneai ekstraktlarında görülen dominant bantların TaA2 izolatına (*T.annulata*/Ankara) göre daha yüksek moleküler ağırlıkta olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte Tunus (JED-4 ve BAT-2), İspanya (Caceras), Mısır (Gharb), Hindistan (Ode) ve Türkiye (Pendik, Diyarbakır, Yenihisar, Hacıali obası (HAO), Akçaova (A.ova) ve Aydın) izolatlarında görülen *T. annulata*'ya özgü bantlar her ne kadar kendi aralarında moleküler ağırlıkları yönünden farklılık gösterebilirlerse de TaA2 suşunda görülen üç dominant bant ile yaklaşık aynı sınırlar arasında ( $\approx 36\text{--}45$  kDa) moleküler ağırlıklara sahip oldukları görülmüştür. *T. annulata*/Ankara klonal D7 izolatında görülen iki dominant bant ise HAO, A.ova ve Caceras izolatları haricinde TaA2 izolatındaki bantlar ile daha fazla benzerlik göstermiştir.



**Resim 2.A.1.** TaA2, D7 (A) ile *T. annulata*'nın farklı izolatlarına (B1 ve 2) ait hücre kültürlerinden hazırlanan protein ekstraktları ile 48 RES 42. gün serum örneği kullanılarak yapılan western blotlama sonucunda belirlenen immunodominant bantlar (*Devam*).

**Resim 2.A.1.** TaA2, D7 (A) ile *T. annulata*'nın farklı izolatlarına (B1 ve 2) ait hücre kültürlerinden hazırlanan protein ekstraktları ile 48 RES 42. gün serum örneği kullanılarak yapılan western blotlama sonucunda belirlenen immunodominant bantlar. (A); TaA2 ve D7 protein ekstraktlarında  $\approx 32.5\text{--}35$  kDa arasında, *T. parva* ile *T. lestoquardi* gibi diğer *Theileria* türlerinde de görülen ortak bant (parçalı, kırmızı ok) ve  $\approx 36\text{--}45$  kDa arasında *T. annulata*'ya özgü olan bantlar (çift çizgili ve noktalı, siyah oklar). (B); TaA2, BL20, D7 ve *T. annulata*'nın A46, Ode, Pendik, Shambai, JED-4, Caceras izolatlarında yüksek pasajlı hücre kültürleri ile inokule edilen hayvanlara ait RES 42. gün serumu kullanılarak western blotlamada görülen farklı moleküler ağırlığa sahip immunodominant bantlar. (C); *T. annulata*'nın JED-4, BAT-2, Pendik, Diyarbakır, Yenihisar, Hacıali obası (HAO), Akçaova (A.ova), Aydın (C1) ile TaA2, Gharb, Caceras, Ode, A46, J1-1, Shambai, Umbaneai (C2) izolatlarında sporozoit ile enfekte hayvanlara ait RES 42. gün serumu kullanılarak western blotlarda görülen farklı moleküler ağırlığa sahip immunodominant bantlar.

Aynı zamanda klonlanarak rekombinant olarak üretilen proteinlere (Çizelge 2.A.3) karşı sporozoit ve yüksek pasajlı hücre kültürleri kullanılarak enfekte edilen hayvanlardan enfeksiyon öncesi, birincil enfeksiyon sonrası 35, 85, 140. gün ve *T. annulata* Gharb suşundan hazırlanan sporozoit stabilatı ile re enfeksiyona tabi tutulmalarını takiben toplanan 7, 28 ile 42. gün serumları (İlhan 1999) kullanılarak western blotlama yöntemi ile yapılan değerlendirme sonuçları Çizelge 2.A.5’de verilmiştir.

30/32 kDa’luk merozoit / piroplasm yüzey antijeni Tams-1 (Glascodine ve ark 1990) ve bunun allelik varyantı olan Tams-2 (Dickson ve Shiels 1993) proteinleri ile yapılan western blotlarda sporozoit ile enfekte hayvanlarda ES 35, 85, 140 ve 210. (REÖ) uncu günlerde antikor yanıt oluşmuştur (Resim 2.A.2, 1A-D). Antikor yanıt ES 85. günde en yüksek seviyelerde iken, ES 35, 140, 210. günlerde daha düşük antikor seviyeleri belirlenmiştir. Bununla birlikte, yüksek pasajlı hücre kültürleri ile enfekte edilen hayvanlarda sadece Tams-1’e karşı ES 35. günde orta düzeyde antikor yanıtı gözlemlenmiş, ancak antikor seviyeleri ES 85, 140, 210 (REÖ) ve RES 7. günlerde giderek azalarak blotlamalarda oldukça zayıf reaksiyon vermeye başlamıştır (Resim 2.A.2, 2A-B). RES 28 ve 42. günlerde ise antikor düzeyi tekrar yükselerek ES 35. günde gözlenen seviyesinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Tams-2’ye karşı yüksek pasajlı hücre kültürleri ile inokule edilen hayvanlarda RES 28. güne kadar herhangi bir antikor yanıt gözlemlenmemiş, 28 ve 42. günlerde antikor seviyesi yükselerek Tams-1’e karşı ES 35. günde gelişen yanıt seviyesine çıkmıştır.

*Theileria annulata* yüzey proteini, TaSP’a (Schnittger ve ark 2002) karşı hem sporozoit hemde yüksek pasaj hücre kültürü inokule edilen hayvan serumlarında blotlama sonucunda oldukça iyi antikor yanıtı oluşmuştur (Resim 2.A.2, 3A-B ve 4A-B). Her iki grup hayvanlara ait ES öncesi serumları ile TaSP arasında proteinin antijenik özelliğine bağlı olarak zayıf düzeyde özgül olmayan reaksiyon görülmüştür. Bunun dışında TaSP’a karşı sporozoitler ile enfekte hayvan serumlarında ES 35. günde orta düzeyde reaksiyon görülürken, antikor seviyeleri ES 85. günden itibaren giderek artmış ve RES 28 ve 42. günlerde proteine karşı oldukça yüksek antikor yanıt görülmüştür. Yüksek pasajlı hücre kültürleri ile inokule edilen hayvanlarda ES 35. gündeki yüksek antikor düzeyine bağlı oluşan reaksiyon 85, 140, REÖ ve RES 7. günlerde azalmasına karşın RES 42. günde blotlama sonrası oluşan yüksek reaktiviteye bakılarak tekrar yüksek düzeylere ulaştığı gözlemlenmiştir.

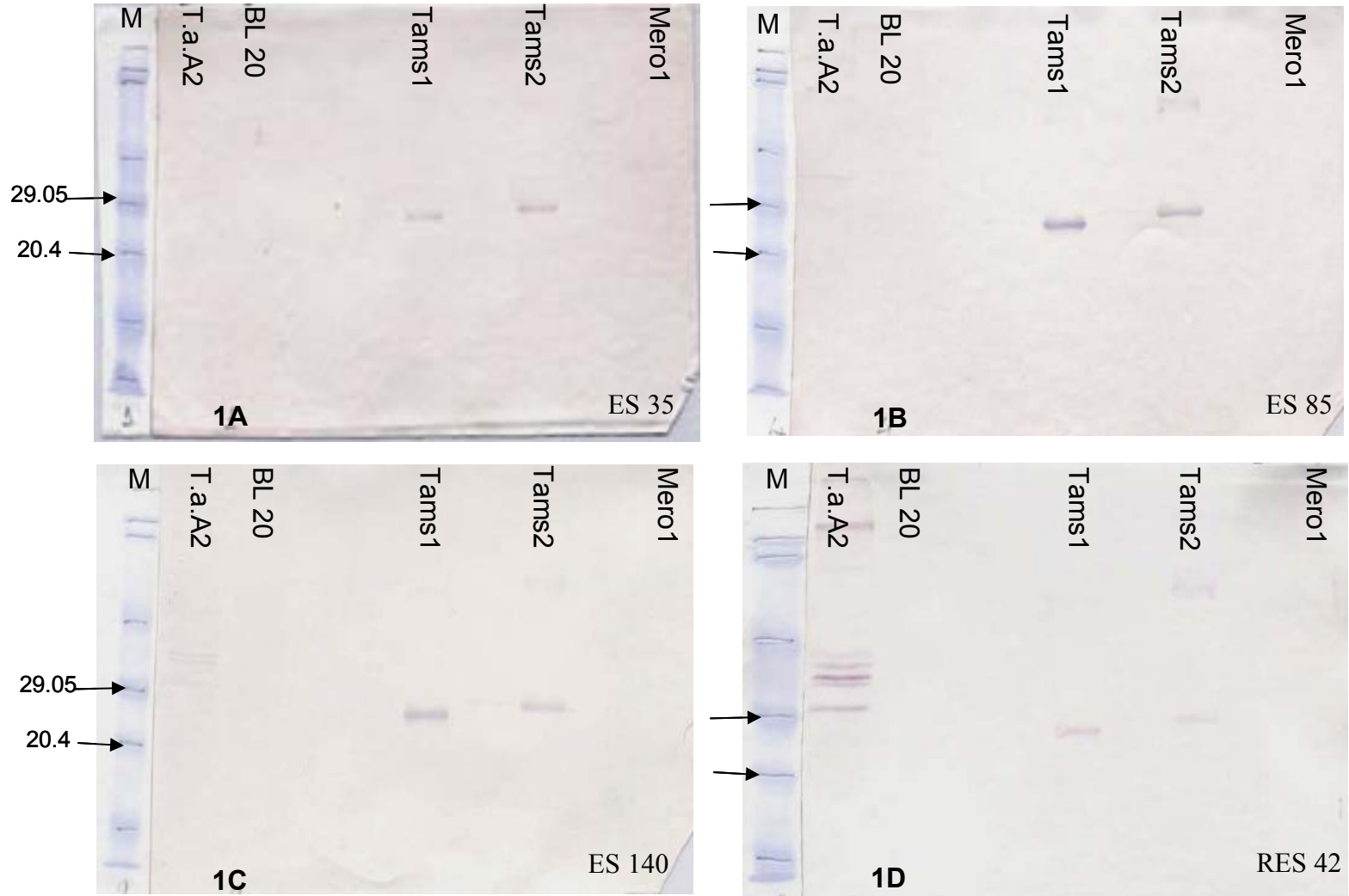
**Çizelge 2.A.5. Üretilen rekombinant proteinler kullanılarak elde edilen Western blot sonuçları**

	Sporozoit enfeksiyonu						Attenüye hücre kültürü ile enfeksiyon									
	EÖ	ES 35.gün	ES 85.gün	ES 140.gün	REÖ	RES 7.gün	RES 28.gün	RES 42.gün	EÖ	ES 35.gün	ES 85.gün	ES 140.gün	REÖ	RES 7.gün	RES 28.gün	RES 42.gün
Tams-1		***	***	**	***	*	*	*	***	***	*	*	*	*	***	■■■■■
Tams-2		**	***	**	**	**	**								***	***
TaSP	*	**	***	***	***	***	***	***	*	***	**	**	***	***	***	***
TA06510		*	**	**	**	**	**	**	**	**	*	**	**		***	***
HSP70		*	**	**	**	**	**	**	*						*	*
MeroI		*	*	**	**	**	**	**	*	*	**	**	**	**	**	**
TA06470	*	*	**	**	*	*	*	*							**	**
TA10720														*		
TA13755 (1.kısım)	*	*	**	*	*	*	*	*								
TA13755 (2.kısım)																
TA20440 (2.kısım)																
RP2/RP4																
TashHN																
SPAG-1	*					*	*									

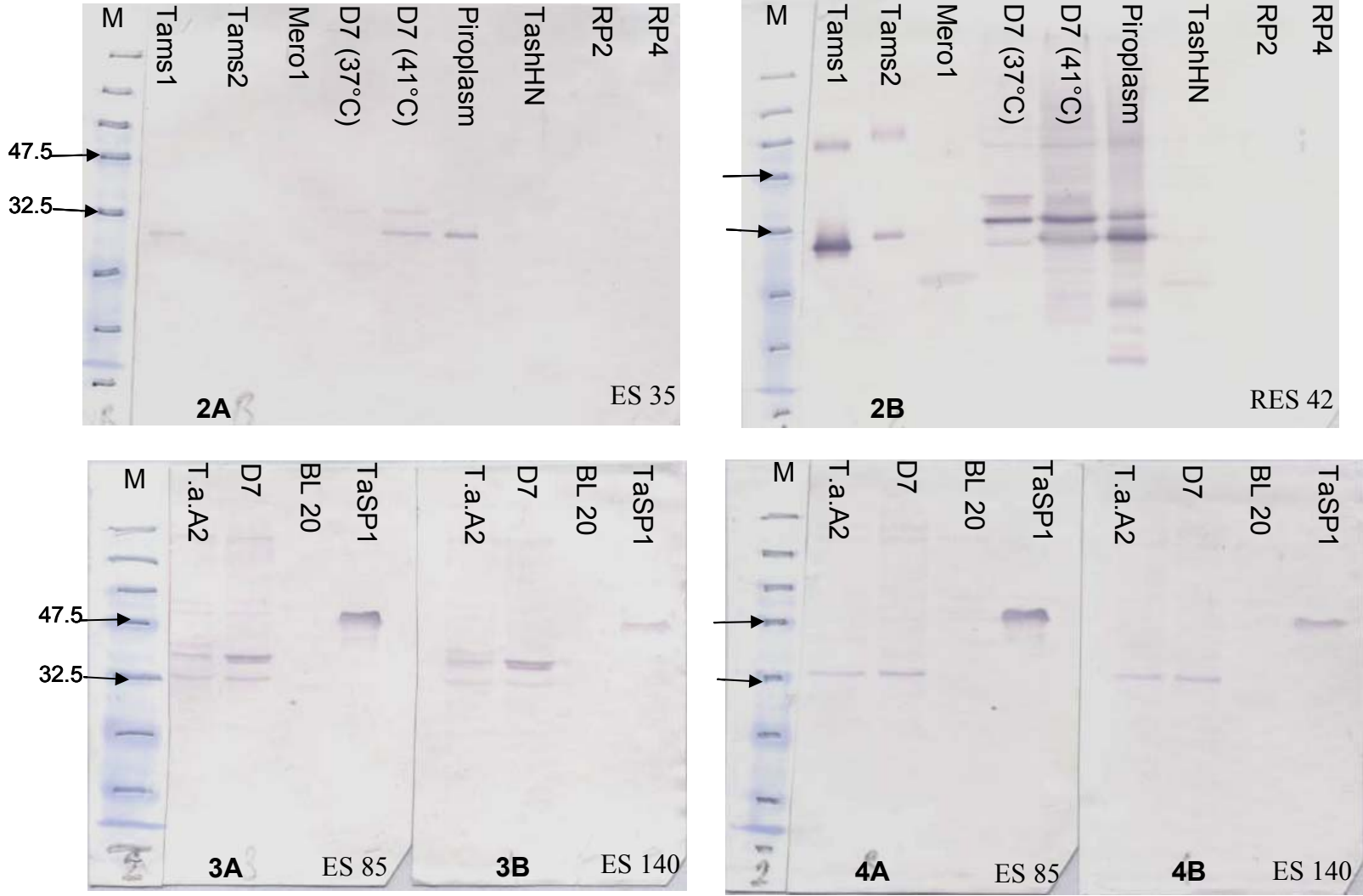
Hipotetik bir protein olan TA06510 ve ısı şok proteini; HSP70 rekombinant proteinlerine karşı sporozoit enfeksiyonu oluşturulan hayvan serumları ile ES 35. günde başlayan zayıf antikor yanıt, ES 85, 140, 210 (REÖ) ve RES 7, 28 ve 42. günlerde orta seviyelerde seyretmiştir. TA06510 rekombinant proteinine karşı RES 28 ve 42. günlerdeki yanıtın (Resim 2.A.2, 5) HSP70'e karşı oluşan yanıtı nazaran az oranda da olsa yüksek oluşuna bağlı blotlamada daha iyi reaksiyon görülmüştür (Resim 2.A.2, 8 ve 9). Yüksek pasajlı hücre kültürleri ile inokule edilen hayvanlarda HSP70'e karşı sadece ES 35 günde zayıf bir reaksiyon oluşurken, TA06510 rekombinant proteinine karşı ES 35, 85, 140 ve 210. günlerde blotlama sonucunda orta düzeyde reaksiyon gözlenmiştir. Bunun yanında, TA06510'e karşı oluşan antikor yanıt RES 28 ve 42. günlerde artmışken, HSP70'e karşı aynı dönemde sadece zayıf bir yanıt olduğu görülmüştür.

GeneDB veri tabanında ts-chitose tip 23 kDa piroplasm yüzey proteini benzeri olarak adlandırılan Mero I rekombinant proteinine karşı sporozoit ve yüksek pasajlı hücre kültürleri ile inokule edilen hayvan serumları kullanılarak yapılan Western blotlarda sadece ES 35 ve 85. günlerde zayıf, ES 140. günde ise orta düzeyde bir reaksiyon görülmüştür. Bunun yanında, yüksek pasajlı hücre kültürleri ile inokule edilen hayvanlarda RES 28 ve 42. günlerde artan antikor seviyesine bağlı blotlarda iyi düzeyde reaksiyon oluştuğu görülmüştür (Resim 2.A.2, 2A-B).

HSP90 homologu şaperon proteini olan TA06470 rekombinant proteini kullanılarak yapılan western blotlamalarda sporozoit ile enfekte hayvan serumları ile ES ve RES tüm örneklerde zayıf bir reaksiyon oluşmuş, yüksek pasajlı hücre kültürleri ile inokule edilen hayvanlarda RES 28 ve 42. günlerde ise blotlamalarda iyi düzeyde reaksiyon gözlenmiştir (Resim 2.A.2, 6 ve 7). TA13755 (I.kısım) rekombinant proteinine karşı sadece sporozoit enfekte serumlarda ES döneminde zayıf bir reaksiyon görülürken, diğer rekombinant proteinlere karşı Western blotlarda reaksiyon gözlemlenmemiştir (Resim 2.A.2, 6 ve 7). Bunların yanında TA06470, TA13755 (I.kısım) ve TashHN rekombinant proteinlerine karşı sadece sporozoit ile enfekte hayvanlardan enfeksiyon öncesi alınan sıfırıncı gün serumları ile zayıf düzeyde özgül olmayan reaksiyonlar gözlenmiştir.

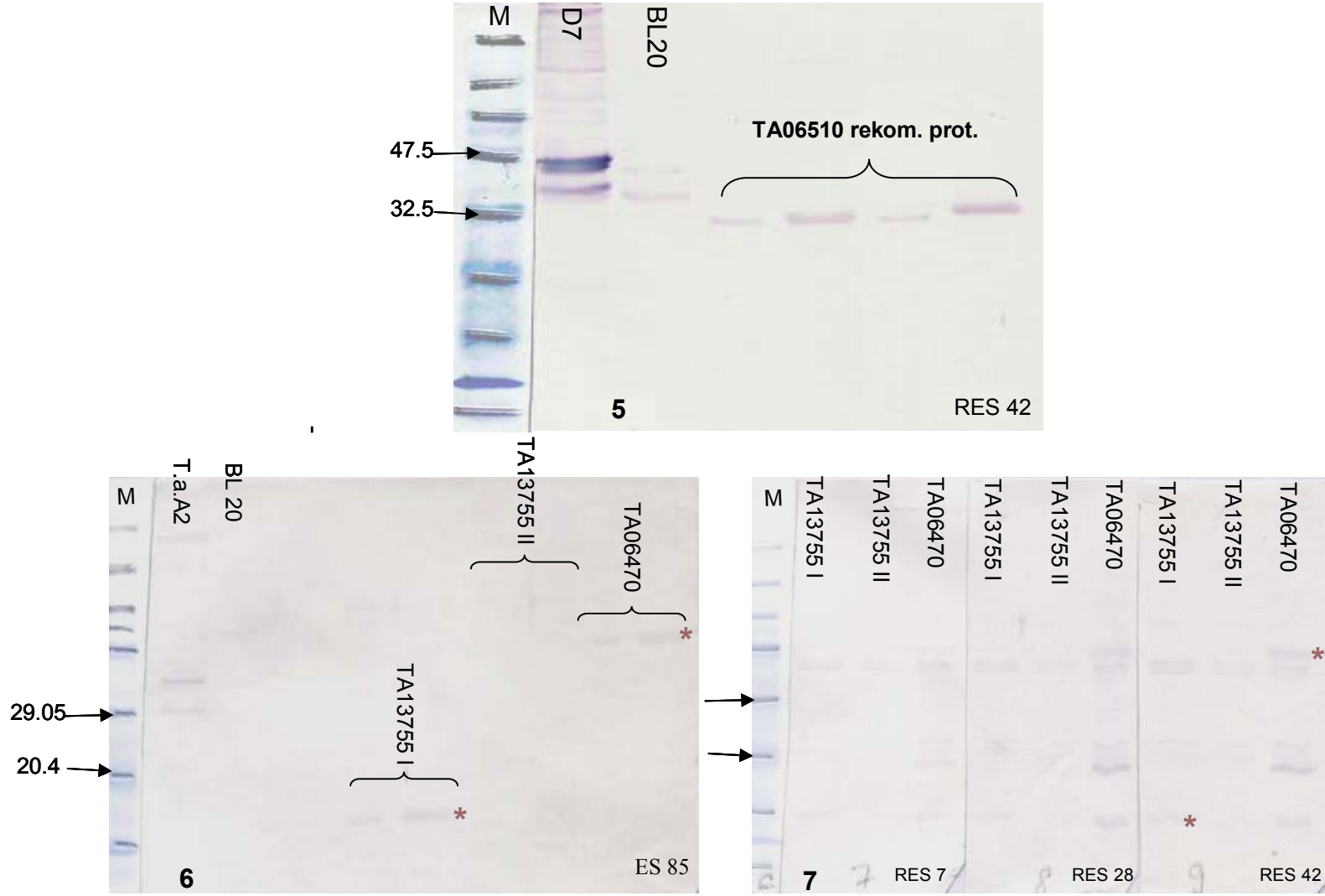


**Resim 2.A.2.** Tams-1/2, Mero I, TashHN, RP2/RP4, TaSP, TA06510, TA13755 (I.kısım) ve TA06470 rekombinant proteinleri ile elde edilen Western blot sonuçları (*Devam*),

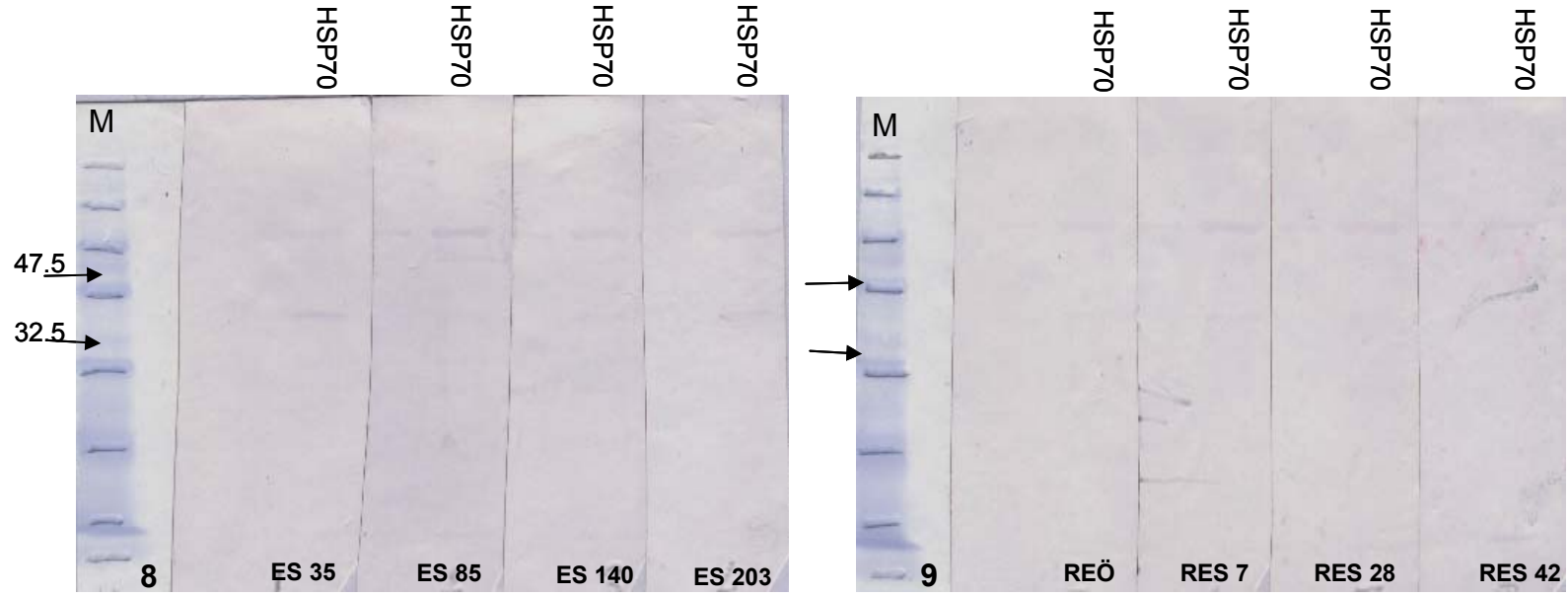


**Resim 2.A.2.** Tams-1/2, Mero I, TashHN, RP2/RP4, TaSP, TA06510, TA13755 (I.kısım) ve TA06470 rekombinant proteinleri ile elde edilen Western blot sonuçları (*Devam*),





**Resim 2.A.2.** Tams-1/2, Mero I, TashHN, RP2/RP4, TaSP, TA06510, TA13755 (I.kısım) ve TA06470 rekombinant proteinleri ile elde edilen Western blot sonuçları (*Devam*),

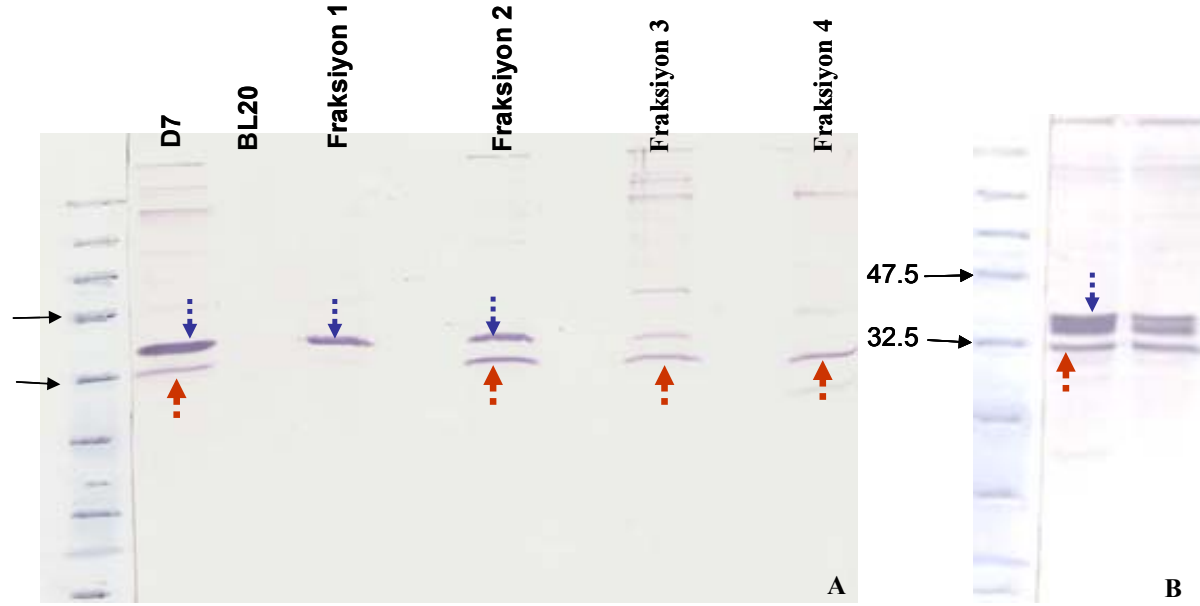


**Resim 2.A.2.** Tams-1/2, Mero I, TashHN, RP2/RP4, TaSP, TA06510, TA13755 (I.kısım) ve TA06470 rekombinant proteinleri ile elde edilen Western blot sonuçları (*Devam*),

**Resim 2.A.2.** Tams-1/2, Mero I, TashHN, RP2/RP4, TaSP, TA06510, TA13755 (I.kısım) ve TA06470 rekombinant proteinleri ile elde edilen Western blot sonuçları. (1A, B, C ve D); TaA2, BL20, Tams-1, Tams-2 ve Mero I proteinleri ile sporozoit ile enfekte hayvanlara ait ES 35 (1A), 85 (1B), 140 (1C) ve RES 42. (1D) gün serumları kullanılarak yapılan Western blot sonuçları. (2 A ve B); Tams-1, Tams-2, Mero I, D7 (37°C), D7 (41°C), piroplasm, TashHN, RP2 ve RP4 proteinleri ile yüksek pasajlı hücre kültürleri ile inokule edilen hayvanlara ait ES 35 (2A) ve RES 42. (2B) gün serumları kullanılarak yapılan Western blot sonuçları. (3 A ve B); TaA2, D7, BL20 ve TaSP proteinleri ile sporozoit ile enfekte hayvanlara ait ES 35 (3A), 140 (3B) gün serumları kullanılarak yapılan western blot sonuçları. (4 A ve B); TaA2, D7, BL20 ve TaSP proteinleri ile yüksek pasajlı hücre kültürleri ile inokule edilen hayvanlara ait ES 35 (4A), 140 (4B) gün serumları kullanılarak yapılan Western blot sonuçları. (5); D7, BL20 ve TA06510 proteinleri ile sporozoit ile enfekte hayvanlara ait RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan Western blot sonucu. (6); TaA2, BL20, TA13755 (I.kısım), TA13755 (II.kısım) ve TA06470 proteinleri ile sporozoit ile enfekte hayvanlara ait ES 85. gün serumu kullanılarak yapılan Western blot sonucu. (7); TA13755 (I.kısım), TA13755 (II.kısım) ve TA06470 proteinleri ile yüksek pasajlı hücre kültürleri ile inokule edilen hayvanlara ait RES 7, 28 ve 42. gün serumları kullanılarak yapılan Western blot sonuçları. (8); HSP70 rekombinant proteini sporozoit ile enfekte hayvanlara ait ES 35, 85, 140 ve ES 203. gün serumları kullanılarak yapılan Western blot sonuçları. (9); HSP70 rekombinant proteini yüksek pasajlı hücre kültürleri ile inokule edilen hayvanlara ait REÖ, RES 7, 28 ve 42. gün serumları kullanılarak yapılan Western blot sonuçları. M; moleküler protein belirleyici (Bio-Rad, İngiltere).

### 2.A.2.3. D7 Hücre Kültürlerinin Alt Hücresel Fraksiyonları

*Theileria annulata*/Ankara izolatının klonal D7 hücre kültürlerinden hazırlanan ekstraktlarda görülen immunodominant proteinlerin alt hücresel fraksiyonlardaki dağılımının belirlenmesi amacıyla yapılan Western blotlama sonucu Resim 2.A.3'de gösterilmiştir. Kit kullanılarak sitoplazmik proteinler (birinci fraksiyon), membran ve membran organelleri (ikinci fraksiyon), nükleik asitler (üçüncü fraksiyon) ile sitoskeletal organeller (dördüncü fraksiyon) olarak dört alt fraksiyona ayrılan hücre ekstraktında görülen  $\approx 32-46$  kDa aralığındaki dominant bantlar, hazırlanan total hücre ekstraktı ile birinci ve ikinci fraksiyonlarında yoğun olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca tüm *T.annulata* izolatları ile *T.parva* ve *T. lestoquardi* türlerinde ortak olarak görülen  $\approx 32$  kDa'luk immunodominant bant ikinci, üçüncü ve dördüncü fraksiyonların tümünde gözlemlenmiştir. Daha düşük ağırlıktaki ikincil bant (Resim 2.A.3, B) ise ( $\geq 42$  kDa) sadece üçüncü fraksiyonda görülmüş, buna ilave olarak aynı fraksiyonda  $\approx 44$  kDa ağırlığında bir, 100–120 kDa aralığında ise dört bant daha gözlemlenmiştir. 100–120 kDa aralığında en düşük moleküler ağırlığa sahip olan bant hem üçüncü hemde dördüncü fraksiyonlarda tespit edilmiştir (Resim 2.A.3, A).



- 1.' inci fraksiyon; sitoplazmik proteinler
- 2.' inci fraksiyon; membran ve mebran organelleri
- 3.' inci fraksiyon; nükleik asit
- 4.' inci fraksiyon; sitoskeletal organaller

**Resim 2.A.3.** Makroşizontlar ile enfekte hücrelerde Western blotlamalarda görülen immunodominant proteinlerin alt hücresele fraksiyonlarındaki dağılımı. **(A)**; D7 hücre kültüründen hazırlanan toplam ve farklı alt hücresele fraksiyonlarına ait protein ekstraktları kullanılarak yapılan Western blot sonucu. Mavi ok işaretleri ile belirtilen bantlar hücreden hazırlanan total, birinci ve ikinci fraksiyonlarında görülen  $\approx 42$  kDa'luk immunodominant bantı göstermektedir. Kırmızı ok işaretleri ile belirtilen bantlar hücreden hazırlanan total, ikinci, üçüncü ve dördüncü fraksiyonlarında görülen  $\approx 32$  kDa'luk ortak immunodominant bantı göstermektedir. **(B)**; D7 hücre kültüründen hazırlanan protein ekstraktlarında western blotlamada görülen immunodominant bantlar.

### 2.A.3. Tartışma

Bu çalışmada, *T. annulata*'nın makroşizont döneminde sentezlenen immonojenik antijenlerin biyoinformatik/fonksiyonel yöntemler kullanılarak belirlenmiş ve bunu takiben Western blot yöntemi ile bağışık hayvanlardaki antikor yanıt değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda en iyi antikor yanıtı oluşturan antijenin tropikal theileriosis'in saha şartlarında enfekte hayvanlarda ELISA yöntemi ile tespitinde kullanılmak üzere seçilmesi amaçlanmıştır.

Biyoinformatik uygulamalar biyolojik bilgilerin değerlendirilmesi ve analizinden kaynaklanan teorik ve pratik sorunların çözülmesi amacıyla veri tabanları, algoritmalar, bilgisayar ve istatistiksel teknikler ile teoriler oluşturularak bunların ilerletilmesine olanak sağlamaktadır. Farklı organizmaların gen dizilimlerini barındıran veri tabanlarında istenen amaca uygun antijenleri kodlayan gen bölgelerinin belirlenmesinde biyoinformatik yöntemlerin kullanımı ile amaçlanan doğrultuda bilgileri yorumlayarak uygun gen bölgeleri belirlenebilmektedir (Fields ve ark 1999). *T. annulata*'nın genom diziliminin belirlenmesi ve dizilimde protein kodlayan gen bölgelerinin ortaya çıkarılması (Pain ve ark 2005) serolojik çalışmalarda kullanılacak antijenlerin belirlenmesi için alternatif yöntemlerin kullanılmasına olanak sağlamıştır.

Antijenin hücre yüzeyinde sunulma miktarı ile antijenin oluşturduğu koruyucu bağışıklık arasında korelasyon olduğu yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (Maione ve ark 2005). *T. annulata*'ya karşı gelişen bağışık yanıtta CD<sup>4+</sup> ve CD<sup>8+</sup> hücreleri rol oynamakta ve bağışıklığın T hücre bağımlı ve bağımsız sistemlerin ortaklığıyla oluştuğu ve makrofajların uzun süreli bağışıklıkta önemli rolü olduğu bilinmektedir (Ahmed ve ark 1989, Seitzer ve Ahmed 2008, Preston ve ark 1999). Sığırlardaki T hücre epitoplarnın belirlenmesinde kullanılan mevcut programlar kısıtlı olup genelde insan MHC allelerinin belirlenmesinde kullanılan programların sığır epitoplarnın belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bunun yanında B hücre epitop belirleme programlarının veri tabanında kayıtlı olan ve fonksiyonel olarak B hücre epitoplarnı içerdiği bilinen motifler ile benzerliklerin karşılaştırılması prensibine dayanması epitop belirlemede kullanılan programların uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır. Biyoinformatik yöntemlerle yapılan incelemede makroşizont antijeni olan TaSP molekülünün korunmuş ve değişken bölgeleri üzerinde MHC sınıf I molekülleri belirlenmiş (Schnittger ve ark 2002) ancak bu epitoplarnın fonksiyonel analizleri hakkında herhangi veri sunulmamıştır. Epitop belirleyici programların yetersizliği genomda kodlanan proteinlerin biyoinformatik özelliklerinin farklı yöntemler ile değerlendirilmesinin önünü

açmıştır. Örnek olarak; *T.annulata*'nın kodladığı Tams-1, SPAG ve TaSP gibi proteinlerde işaret peptidleri bulunmaktadır (Katzner ve ark 1994, d'Oliveira ve ark 1996, Schnittger ve ark 2002). Bu tür proteinlerde gözlenebilen transmembran alan sitoplazma içerisinde bir uzantı halinde bulunmakta ve özellikle plasma membranının hücre dışı kısmında lokalize olmaktadır. GPI tutucular proteinlerde çok sık olarak görülen değişikliklerden biri değildir ve bu motifin bulunması yapılacak biyoinformatik çalışmalarda ayırıcı bir parametre olarak kullanılabilir. *T.cruzi*'ye karşı gelişen koruyucu bağıklığın şekillenmesinde GPI tutuculu proteinlerin etkinliği bilinmektedir (Bathia ve ark 2004). Buna ek olarak protozoalarda, GPI bağlayıcıların ağırlıklı işlevi hücre yüzey proteinlerini lipid katmanla birleştirmektir (Turner 1994). Bundan dolayı, parazitlerin hücre dışı invazif dönemlerinde genlerin kodladığı proteinlerde GPI tutucular belirginken, parazitin hücre içi dönemlerinde çoklu transmembran alanlar bulunmaktadır. Sporozoit ve makroşizont döneminde sentezlendiği bildirilen TaSP molekülde muhtemelen proteinin parazit mebranına bağlanmasını sağlayan üç transmembran alan bulunmakta (Schnittger ve ark 2002), sporozoit yüzey antijeni olan SPAG ve merozoit/piroplasm yüzey antijeni Tams proteinleri GPI anchor ihtiva etmektedir. Tams-1, SPAG, Tamr ve TaSP moleküllerine karşı konak vücudunda antikor yanıtın varlığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Gubbels ve ark 2001, Darghouth 2008, İlhan ve ark 1998, Seitzer ve ark 2007).

Farklı bir biyoinformatik parametre olan dN/dS oranları ortolog genler üzerindeki evrimsel baskının değerlendirilmesi ve immunojenik özellik gösterebilecek genlerin belirlenmesinde kullanılabilir (Pain ve ark 2005, Endo ve ark 1996). *T. annulata*'da, *Plasmodium*'a benzer şekilde merozoit yüzey proteinlerini kodlayan genlerde dN/dS oranları yüksek oluşu bu proteinlerin immün seleksiyonda rol oynayabileceklerini düşündürmüştür (Hall ve ark 2005, Gubbels ve ark 2001). Makroşizont döneminde SP içeren polipeptidlerin dN/dS oranları yüksek bulunmasına karşın bu oranın merozoit döneminden daha düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, lökosit sitoplazmasına salınan ve herhangi bir membran bağlanma motifi içermeyen makroşizont proteinlerinde dN/dS oranının yüksek olduğu bilinmektedir (Pain ve ark 2005). Konağa salgılanma ile ilişkili olarak belirlenen yüksek dN/dS oranı bu genlerin düzenleyici rollerini yansıtabileceği düşünülmüştür. Alternatif olarak bu yüksek oranda yıkılan proteinlerin doku uyumu kompleksleri ile enfekte hücre yüzeyinde sunularak immün sisteme maruz kalınmasında ifade edebilmektedir. Buna uygun olarak yapılan incelemelerde bu polipeptidlerin çoğunda PEST motiflerine rastlanmış ve motifi içeren proteinlerin büyük bölümünü çekirdek lokalizasyon sinyali içeren TashHN, TashAT ve SUAT proteinlerinin oluşturduğu belirlenmiştir (Pain ve ark 2005).

Bu çalışmada *T. annulata*'nın makroşizont dönemine özgü proteinler biyoinformatik yöntemler kullanılarak Signal P, GPI anchor, TMD ihtiva edip etmemedikleri, EST verileri ve dN/dS oranları ile PEST ve benzeri motif alanlar içerip içermediklerine bakılarak birbirleri arasında karşılaştırılması amaçlanmıştır. Yapılan incelemelerde parazitin farklı yaşam dönemlerinde değişen miktarlarda sentezlenen toplam 3783 genin 572 tanesinin signal peptid, 843 tanesinin her gen üzerinde farklı sayılarda (1–24) olmak kaydıyla transmembran alan ve 73 tanesininde GPI anchor içeren genler olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.A.2). GPI anchor içeren 73 genden 17 tanesi GPI anchor ile TMD, 44 tanesinde GPI anchor ve SP ihtiva etmektedir. Geri kalan 12 genin ise sadece GPI anchor içerdiği belirlenmiştir. Signal peptid içeren 572 ve TMD içeren 843 genden 270 tanesi sadece SP ve 560 tanesi sadece TMD içerirken, 19 gen SP+GPI anchor, 258 gen SP+TMD ve 25 gende SP+TMD+GPI anchor içermektedir. SP+GPI anchor içeren genler EST verileri ve dN/dS oranlarına göre sıralananarak dört ve daha fazla TMD içerenler, signal motifi bulunduğu halde hiçbir transmembran ve GPI motifi bulunmayanlar ile düşük dN/dS oranına ( $\leq 0.1$ ) sahip olanlar (HSP70 hariç) belirlenerek (Çizelge 2.A.4) excel formatında sıralanmışlardır. En üst sırada yer alan merozoit rhoptri antijeni TA08425 (Tamr-1) SP+GPI+TMD içeren bir protein olup yapılan denemelerde bu proteinin düşük pasajlı hücre kültürü ve sporozoitlerle enfekte hayvanlardan elde edilen serumlar tarafından tanınabildiği, ancak yüksek pasajlı hücre kültürleri ile aşılardan hayvanlardan elde edilen serum örneklerinde proteine karşı bir yanıt olmadığı belirtilmiştir (İlhan ve ark 1998). SP+GPI+TMD içeren diğer TA06510, TA07565, TA12850 genleri arasından sadece en yüksek makroEST verisine sahip olan TA06510 proteini seçilerek klonlanmış, diğer proteinleri ise gerek düşük dN/dS oranları gerekse çok sayıda intron içermeleri sebebiyle klonlanmamışlardır. Parazitin makroşizont döneminde sentezlenen (MakroEST: 11), C-terminalinde GPI anchor bağlanma bölgesi ile 288–310. amino asitler arasında bir adet membran bağlanma motifi (TMD) içeren, N-terminalinde ise SP ihtiva eden TA06510 proteini 936 bp'lık tek bir ekson tarafından kodlanan 36.9 kDa moleküler ağırlığa sahip bir proteindir. Genelde parazitin makroşizont döneminde sentezlenen proteinlerde GPI bağlayıcıların yer alması beklenmeyen bir durumdur (Wier, 2006). DGPI (2.04) programı ile 286. amino asitte belirlenen GPI kesim bölgesi (0.348) muhtemelen pek fazla önem arz etmemektedir. Bunun yanında SP ve tek TMD proteinin salgısal yapıda olduğunu ve muhtemelen şizont membranında lokalize olduğunu düşündürmesine karşın yapılan analizlerde (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=toppred>) her hangi bir membran topolojisine rastlanmamıştır. Bunun yanında Western blot sonuçlarına göre hem sporozoit hemde yüksek pasajlı hücre kültürü ile enfekte hayvan serumlarında proteine karşı



oluşan antikor yanıtın seviyesi düşük olmasına karşı re enfeksiyon sonrasındaki dönemde her iki grup hayvan serumlarındaki antikor seviyesinde şekillenen artış ilk enfeksiyon esnasında proteine karşı oluşan B hücresel yanıtın muhtemelen sitotoksik T hücrelerince lize edilen enfekte hücrelerden arta kalan şizont membranlarına karşı gelişebileceğini akla getirmektedir. Ancak oluşan antikor yanıtın hangi dönemde şekillendiğinin belirlenmesi için ayrıntılı laboratuvar çalışmaları yapılmalıdır.

Yapılan çalışmalarda immunijen olduğu bilinen (Seitzer ve ark 2007) TaSP'ın karakteristik özelliklerine (SP, TMD, EST ve dN/dS gibi) benzerlik gösteren TA20980, TA20440, TA13755 proteinleri arasında TA20980 haricindekiler seçilerek rekombinant olarak üretilmiştir. Biyoinformatik yolla belirlenen *T. lestoquardi* benzeri olan ve parazitin makroşizont ve merozoit dönemlerinde sentezlenen, N-terminalinde SP içeren ve quinonprotein alkol dehidrogenaz benzeri alanlar ihtiva eden TA20980 proteini ile daha önceki dönemlerde ELISA ile yapılan araştırmalarında antikor düzeyinin iyi sonuç vermediği (İlhan 1999) bildirilmiştir. Parazitin makroşizont ve merozoit dönemlerinde sentezlenen TA20440 ve TA13755 proteinleri içerdikleri SP ve üçer membran bağlanma alanı, EST verileri ve yüksek dN/dS oranları ile TaSP molekülünü andırmaktadır. TA20440 rekombinant proteinine karşı bağışık serumlar ile yapılan blotlamalarda her hangi bir antikor yanıtı rastlanmamış olması bize bu proteinin bağışıklık sistemi ile karşılaşmadığını göstermektedir. Pfam 24.0 veri tabanında yapılan incelemelerde veri tabanında kayıtlı protein aileleri ile istatistiksel öneme sahip her hangi bir eşleşmeye rastlanmamıştır. Bunun yanında TA13755 rekombinant proteinine karşı görülen düşük antikor yanıtı benzer motifleri taşıyan ve immunojenik olduğu bilinen TaSP, Tams-1 veya SPAG gibi proteinler ile benzer motifleri taşıyor olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. *T. parva*'ya ait PIM ve p150 proteinlerinde (Baylis ve ark 1993, Toye ve ark 1995b, Skilton ve ark 1998) olduğu gibi, birbirleri ile düşük düzeyde dizilim benzerliği gösteren ancak aralarında benzer yapıya tekrarlı motifler (QP motifleri gibi) bulunan proteinler konak bağışıklık sistemi tarafından immunojenik olarak algılanmakta ve bu tür proteinler arasında çapraz reaksiyonlar görülebilmektedir. Dizilim benzerlikleri ve bu türlü tekrarlı peptid alanları moleküller arasındaki benzer fonksiyonlara işaret edebildiği gibi, PIM ve p150 gibi ortak bir atadan da kaynaklanabilmektedir (Skilton ve ark 1998). TA20440 ve TA13755 hipotetikel proteinleri arasında amino asit düzeyinde SP ve membran bağlanma alanları içermeleri haricinde fonksiyonel her hangi bir veri bulunmamaktadır.

*Theileria annulata* yüzey proteini, TaSP (Schnittger ve ark 2002) molekülünün, *T. parva*'nın polimorfik immunodominant molekülü (PIM) (Toye ve ark 1995) ile gösterdiği

homolojiye bakılarak onun *T. annulata*'daki ortoloğu olan immunodominant protein olabileceği belirtilmiştir (Schnittger ve ark 2002). Bu çalışmada rekombinant olarak üretilen TaSP molekülünün polimorfik merkezi bölgesi ile yapılan Western blotlar sonucunda hem sporozoit hemde yüksek pasaj hücre kültürü inokule edilen hayvan serumlarında proteine karşı oldukça iyi düzeyde antikor yanıt oluştuğu belirlenmiştir. TaSP molekülü hakkında bilgi ve yapılan analizlerde elde edilen sonuçlar Bölüm 2.3 (TaSP Molekülünün İmmunodominant Makroşizont Antijeni Olup Olmadığının Belirlenmesi ve İmmunodominant Bantların Tanımlanması)'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Proteinlerde bulunabilecek muhtemel peptid motiflerinin belirlenmesi amacıyla yapılan incelemelerde sadece TaSP molekülünde PEST motifine rastlanırken, diğer proteinlerde bu motife rastlanmamıştır. Ayrıca TA15040, TA12850 proteinlerinde bir, Tams-1'de ise iki tane FAIN domain bulunmuştur. Bu alanların fonksiyonları tam olarak bilinmemekte ve farklı genler üzerinde farklı sayılarda yer alabilmektedirler (Pain ve ark., 2005). Bunun yanında rekombinant olarak üretilen TA06510, TA20440, TA13755, TaSP, Tams-1 ve Mero I polipeptidlerinde de birer adet FAIN domain belirlenmiş olmasına karşın bu alanların veri tabanında kayıtlı olan motifler ile benzerlikleri çok düşük düzeydir.

İmmunodominant *Theileria* merozoit antijenlerine ait protein ailesi (Pfam 24.0) içerisinde yer alan *T. annulata*'nın 30/32 kDa'luk merozoit/piroplasm yüzey antijeni Tams-1 (Glascode *et al* 1990e) ve TaA2 stoğundan elde edilen klonlarda moleküle ait 30 kDa ve 32 kDa moleküler ağırlığındaki iki allelik varyanttan diğeri olan Tams-2 (Dickson and Shiels 1993b) proteinleri ile yapılan Western blotlarda özellikle Tams-1 rekombinant proteinine karşı hem sporozoit hem de yüksek pasaj hücre kültürü inokule edilen hayvan serumlarında TaSP molekülü kadar yüksek olmasa da iyi düzeyde bir antikor yanıt oluşmuştur. Yüksek pasaj hücre kültürü inokule edilen hayvanlarda re enfeksiyon sonrası elde edilen serum örneklerindeki antikor yanıt sporozoit ile enfekte hayvanların aynı dönem ki serumlarına oranla daha yüksek olarak belirlenmiştir. Tams-2 rekombinant proteinine karşı sporozoit ile enfekte hayvanlarda Tams-1'e benzer bir antikor cevap oluşurken, yüksek pasaj hücre kültürü inokule edilen hayvan serumlarında enfeksiyon sonrası dönemde bir antikor cevap görülmemiş, bununla birlikte re enfeksiyon sonrası 28 ve 42. günlerde gelişen bir antikor cevap oluşmuştur. Tams molekülünün alleleri (Tams 1 ve 2) arasında korunmuş antijenik epitoplara bulunmasına karşın, her proteine özgün epitoplara olduğu da belirlenmiştir (Dickson ve Shiels 1993). Tek kopyalı bir gen olan Tams-1 geni farklı haploid genotiplere uygun olarak genin farklı allellere ait RFLP analizlerinde Tams-1 genine ait farklı boyutlardaki alleler Tams1-1 (30 kDa) ve Tams1-2 (32 kDa) olarak adlandırılmıştır. Her iki varyantta 281 amino

asitten oluşan, N-terminal kısımlarında signal dizilime ve C-terminalinde ise GPI motifi bulunan proteinlerdir (Shiels ve ark 1995). Tams-2 rekombinant proteinine karşı yüksek pasajlı hücre kültürü ile enfekte edilen hayvanlarda enfeksiyon sonrasındaki dönemde antikor cevap görülmemesi attenüasyon ile populasyonda bulunan genotip sayısında seleksiyona bağlı oluşan azalma sonucunda (Gill ve ark 1980) Tams-1 allelik varyantlarını kodlayan genotiplerin seleksiyona uğramasına bağlı olarak gelişmiştir. Bunun yanında, Tams ile yapılan aşılama çalışmalarında homolog şuşlarla oluşturulan re enfeksiyonlara karşı optimal koruma sağlarken (Gill ve ark 1980, Darghouth ve ark 1996a), heterolog şuşlara karşıda iyi bir direnç geliştirdiği bildirilmiştir (Hashemi-Fesharki 1988, Darghouth ve ark 1996a). Bu da bize yüksek pasajlı hücre kültürü ile enfekte edilen hayvanlarda *T. annulata* Gharb sporozoitleri ile oluşturulan re enfeksiyonu takiben eden dönemde Tams-2 rekombinant proteinine karşı oluşan antikor cevabı açıklamaktadır.

27 kDa'luk piroplasm yüzey proteini olan MeroI; TA13810 geni tarafından kodlanan ve *T. annulata*'nın ikinci kromozomunun merkezi bölgesi üzerinde benzeri iki gen ile birlikte bir grup oluşturmaktadır (Weir 2006). TA13810, ortoloğu olduğu *T. sergenti*'de identifiye edilen a 23 kDa'luk piroplasm antijeni (Zhuang ve ark 1995) ile %57 homoloji gösteren (Weir 2006). 24–25. amino asitler arasında signal dizilim kesim bölgesi bulunan, Tams-1'e benzer şekilde parazitin merozoit ve piroplasm dönemlerinde sentezlenen ve 690 bp büyüklüğünde, tek bir ekzon tarafından kodlanan bir proteindir (GeneDB). Proteinin C-terminalinde 204–226. amino asitler arasında belirlenen membran bağlanma motifi içerisinde GPI bağlanma alanı bulunmaktadır (Weir 2006). MeroI rekombinant proteinin ile yapılan Western blotlamalarda proteine karşı düşük düzeyde bir antikor cevap olduğu görülmüştür. *SVSP* ailesinde yer alan genlerin parazitin makroşizont döneminde sentezlendiği varsayılmaktadır (Pain ve ark 2005). *SVSP* gen ailesinde bulunan proteinlerin ortak korunmuş bölgelerini kapsayan RP2 ve RP4 rekombinant proteinleri kullanılarak yapılan blotlama sonuçlarında bu moleküllerin hiç birine karşı antikor cevap görülmemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *SVSP* proteinlerine ait korunmuş bölgelerde yer alan ve konak sitoplazmasına salınarak muhtemel MHC sistemi ile işlendikten sonra hücre yüzeyinde sunulduğu düşünülen (Weir 2006) RP2/RP4 rekombinant proteinlerine karşı konakta herhangi bir yardımcı T lenfosit aracılı yanıtın şekillenmediği söylenebilir. Bununla birlikte RP2 ve RP4 bölgeleri ailede yer alan tüm genler tarafından kodlanan ve immunojen olabilecek ortak bir alanı ifade etmeyebilir. Aile içerisinde yer alan diğer *SVSP* proteinlerinin tek tek ele alınarak içerebilecekleri muhtemel epitoplar yönünden hem biyoinformatik yöntemler hemde fonksiyonel testler ile değerlendirilmesi gereklidir.

*Theileria annulata* sporozoitlerine karşı gelişen humoral bağışıklıktan sorumlu antijeni kodlayan gen bölgesi olan SPAG-1 (Williamson ve ark 1989), tek bir gen bölgesi tarafından kodlanan ve farklı alleller arasında yüksek oranda polimorfizm gösteren, sporozoit yüzeyinde yerleşim gösteren 93kDa moleküler ağırlıkta, farklı alleller arasında korunmuş N- ve C-terminalinde sırasıyla signal peptid (1-19 amino asitler), membran bağlanma alanı (894-916. amino asitler) ve bunun içerisinde yer alan GPI kesim bölgesi (896. amino asit) olan bir proteindir (Hall ve ark 1992). Sporozoitlere karşı geliştirilen 1A7 monoklonal antikoru kullanılarak yapılan çalışmalarda C-terminal kısımda proteini nötralize eden bölgenin varlığı tespit edilmiş (Boulter *et al* 1994a) ve bunu takiben SPAG-1'in C-terminal kısmı hepatit B merkez antijeni ile birleştirilerek üretilerek (Boulter ve ark 1995) sığırların aşılmasında kullanılmıştır. Aşılanan hayvanlardaki sporozoit yüzeyini belirleyen antikor titresi oldukça yükselmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada, SPAG-1'in iyi bir T hücre yanıt oluşturduğu ve hem B hücre hem de T hücre epitopu içerebileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada SPAG-1 rekombinant proteini kullanılarak yapılan Western blotlarda ne sporozoit ile enfekte hayvanlardan nede yüksek pasajlı hücre kültürü ile enfekte hayvanlarda enfeksiyon sonrası serumlarında her hangi bir antikor yanıtı rastlanmamıştır. Enfekte kenelerle tekrarlanan enfestasyona maruz kalan hayvanlarda sporozoitlere karşı humoral bağışıklık oluştuğu bilinmektedir ve inaktive edilmiş sporozoitler kullanılarak yapılan deneysel çalışmada, hayvanlar tekrar enfeksiyona maruz bırakıldıklarında makroşizont gelişiminde yavaşlama görülmüştür. Bununla birlikte, doğal ortamda sporozoitlere karşı gelişen bağışıklığın hayvanları tropikal theileriosis'e karşı tam olarak korumasının beklenemeyeceği belirtilmiştir (Williamson ve ark 1989). Western blot analizleri sonucunda re enfeksiyon sonrası 42. günde SPAG-1 rekombinant proteinine karşı oldukça zayıf antikor yanıtı rastlanmış olması proteinin saha şartlarında kullanılabilirliğinin tekrarlayan kene enfestasyonuna maruz kalma ile direkt ilişkili olduğunu ve az sayıda sporozoit ile enfekte keneler ile oluşacak enfeksiyonların belirlenmesinde yetersiz kalacağını göstermektedir.

Isı şoku yada stres proteinleri prokaryot ve ökaryot hücrelerde sentezlenen oldukça korunmuş proteinler olup, proteotoksik ısı şoku ve diğer çevresel stres faktörlerine karşı hücrede koruma sağlamaktadırlar (Craig ve ark 1993). Isı şoku proteinleri konak-patojen ilişkisinde önemli role sahiptirler. Bakteriyel patojenler ve konak hücre tarafından üretilen ısı şoku proteinleri konak bağışıklık sistemini aktive eder ve patojenleri hücre içerisinde oluşan stres koşullarından korurlar (Ottenhoff ve Bevan 2004). Bu proteinler moleküler ağırlıklarına göre büyük (HSP100 ve HSP90; 75-110 kDa), orta (HSP70; 66-78 kDa, HSP60 ve HSP40) ve küçük (sHSP; 8.5-40 kDa) alt ailelerine ayrılmışlardır. Isı şoku proteinleri buldukların

hücrelerde yeni sentezlenen proteinlerin üçüncül ve/veya dördüncül yapılarını kazanmaları ve ısı şokuna maruz kalanların ise tekrar konformasyonel yapılarına dönmelerinde, hücre içi iletişim, protein yıkımlanması, fiziksel gelişim (Nadeau ve ark 1993, Jakob ve Buchner 1994) ve kanserli hücrelerde proteinlerin fosforilasyonunda etkili olmaktadır (Workmann 2004). HSP70 şaperonları ise sentezlenen proteinlerin doğru olarak katlanarak üçüncül ve / veya dördüncül yapılarını kazanmalarına yardımcı olup proteinlerin hücre içerisinde normal fonksiyonlarını yerine getirmesini sağlayan asıl yapılardır (Bukau ve Horwich 1998). *T. annulata* genomunda HSP70 proteinin kodlayan TA11610 geni yanında, HSP70 homoloğu proteinleri kodlayan iki adet daha gen bölgesi yer almaktadır (TA14920 ve TA10500: GeneDB). TA11610 geni tarafından parazitin makroşizont, merozoit ve piroplasm dönemlerinde sentezlenen HSP70 proteini 71kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Bunun yanında diğer bir grup şaperon proteini olan HSP90, *Theileria* ile enfekte hücrelerde klonal çoğalmadan sorumlu olduğu düşünülen ve temel olarak parazit kökenli olarak aktive edilen İkB kinaz (IKK)'ın (Heussler ve ark 2002) biyosentezinde rol oynadığı bilinmektedir (Broemer ve ark 2004). *T. annulata* genomunda bulunan TA12105, TA06470, TA10720 ve TA06845 gen bölgeleri HSP90 homoloğu proteinleri kodlayan ve aynı aile içerisinde yer alan genlerdir. TA10720 parazitin merozoite döneminde sentezlenen, *T. annulata*'nın dördüncü kromozom üzerinde yer alan ve ısı şok proteini HSP90 homoloğu olan bir proteindir. Bu proteinin PlasmoAP programı kullanılarak yapılan analizlerinde proteinin parazit apikoplastına özgü olduğu belirlenmiştir (GeneDB). 104 kDa ağırlığındaki proteinin peptid zincirinin N-terminalinde SP (1–40 amino asitler) ve membran bağlanma motifi (21–40 amino asitler) bulunmaktadır. TA06470 parazitin makroşizont, merozoit ve piroplasm dönemlerinde sentezlenen, birinci kromozom üzerinde yerleşik ve HSP90 ailesine bağlı şaperon bir proteindir. 115 kDa moleküler ağırlığa sahip olan, peptid zincirinin N-terminalinde SP (1–20 amino asitler) bulunan ve konak çekirdeğinde yada sitoplazmasında yerleştiği düşünülen bir proteindir. Bu çalışmada HSP70, TA06470 ve TA10720 rekombinant proteinlerine karşı gelişebilecek antikor yanıtın incelenmesi amacıyla yapılan Western blotlamalarda sadece HSP70 rekombinant proteinine karşı düşük bir antikor yanıt gözlemlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda HSP70 proteinine karşı Western blotlarda pozitif antikor yanıtın geliştiği bildirilmekle (Kachani ve ark 1992b) birlikte mikroarray analizlerinde bu proteinin parazitin konak vücudunda geçen tüm dönemlerinde diğer şaperon proteinlerine nazaran oldukça yüksek oranda sentezlenmesi (Weir W, yayınlanmamış veri) konak bağışıklık hücrelerinde bu proteine karşı düşüğe olsa oluşan antikor cevabı açıklamaktadır. HSP90 homoloğu olan proteinlere karşı antikor cevabının olmayışı muhtemelen bu proteinlerin *Theileria* ile enfekte

hücrelerde klonal çoğalmadan sorumlu olduğu düşünülen ve temel olarak parazit kökenli olarak aktive edilen I $\kappa$ B kinaz (IKK)'ın (Heussler ve ark 2002) biyosentezinde (Broemer ve ark, 2004) rol almasından kaynaklanmış olabilir. Oluşan ısı şoku proteinleri T hücrelerini tekrar aktive ederek IL-10 üretimine indükleyerek bağışıklığı inhibe ederler. Ancak konak hücre ve patojen arasındaki ilişkide kritik bir role sahip ısı şoku proteinlerinin bu fonksiyonlarını nasıl gerçekleştirdikleri oldukça kompleks olup, halen tam anlamıyla anlaşılabilmiş değildir (Ottenhoff ve Bevan 2004).

Bu çalışmada, *T. annulata*'nın farklı izolatlarına ait hücre kültürlerinden hazırlanan protein ekstraktları kullanılarak yapılan Western blot analizlerinde görülen dominant bantlar arasında hem yoğunluk hemde büyüklük yönünden farklılıklar görülmüştür. Aynı genotipe sahip klonal D7 ve D7 hücre kültürü ile enfekte hayvanlarda beslenen kenelerden elde edilen sporozoitler ile enfekte bovine lenfosarkoma hücrelerinden (D7BL12) hazırlanan protein ekstraktları kullanılarak yapılan Western blotlar sonucu elde edilen bantlar arasında yoğunluk farklılıklarının proteinler arasındaki ekspresyon farklılıklarına bağlı olabileceği bildirilmiştir (İlhan 1999). Aynı zamanda *in vitro* klonlama sonrası hücre kültürlerinde meydana gelen adaptasyona bağlı gen ekspresyonlarında değişimler olduğu bilinmektedir (Baylis ve ark 1992, Shiels ve ark 1994, Sutherland ve ark 1996). Bu çalışmada *T. annulata* Ankara izolatına ait klonlanmamış TaA2, A46 ve J1-1 gibi farklı klonları, tek bir klon olan D7 ile *T. annulata* ile enfekte bovine lenfosarkoma hücrelerinden (TBL) hazırlanan protein ekstraktlarında TaA2, A46, J1-1 ve TBL ekstraktında D7 ekstraktına göre farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Klonal D7 ekstraktında görülen  $\approx$ 32 kDa ağırlığındaki ortak bant haricindeki diğer bantlar ( $\approx$ 36–42 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip bantlar) TaA2 dışındaki ekstraktlarda belirgin bir yoğunlukta görülmemektedir. Bununla birlikte TaA2 ekstraktında en üstte dominant olarak görülen  $\approx$ 45 kDa'luk bant D7 ekstraktında görülmemektedir. Aynı izolata ait farklı klonlara arasında görülen bu farklılıklar klonlama esnasında meydana gelen adaptasyon ve gen ekspresyonundaki değişimlere bağlı olabileceği gibi aynı izolatta yer alan farklı genotiplerdeki parazit popülasyonlarından da kaynaklanabilmektedir. Benzer şekilde, *T.annulata* (Weir 2006) ve *T. parva* (Oura ve ark 2003)'da saha şartlarında hayvanlarda enfeksiyon oluşturan parazit popülasyonlarının farklı genotiplere sahip etkenler tarafından oluştuğu bildirilmiştir. Popülasyonu oluşturan farklı genotipdeki parazitler kenelerin enfekte hayvanlardan kan emmeleri yoluyla alınarak vektördeki seksüel çoğalma evresinde rekombinant genotipleri oluşturduğuna (Ben Miled 1993) dair veriler bulunmaktadır. Daha sonra yapılan genetik analizler sonucunda *T. annulata*'nın saha izolatlarında bulunan popülasyonlarda genetik rekombinasyon olduğu doğrulanmıştır (Weir 2006). *Plasmodium*

türlerinde oluşan rekombinasyon miktarının bulaşma yoğunluğuyla ilişkili olduğu ve bulaşma yoğunluğunun yüksek olan alanlarda farklı populasyonların yoğun olduğu bildirilmiş (Anderson ve ark 2000) ve *T. annulata*'da yüksek sayıda genotipe rastlanması benzer şekilde yüksek bulaşma yoğunluğuna işaret edebileceği belirtilmiştir (Weir 2006). Enfekte hayvanlarda izole edilen hücre kültürleri ve piroplasmalarda da yüksek düzeyde miks enfeksiyonlar bulunabilmektedir. İzole edilen bir stokta TS8 markerı kullanılarak yapılan analizlerde 10 allel belirlenmiş ve asıl izolatta en az 10 farklı genotipte parazit populasyonunun yer alabileceği belirtilmiştir (Weir 2006). Bunun yanında parazitin sporozoit, makroşizont, merozoit ve piroplasm dönemlerine özgü mRNA'lar kullanılarak yapılan mikroarray analizleri sonucunda kimi gen bölgeleri tarafından kodlanan mRNA'ların parazitin yaşam dönemleri arasında yukarı ve/veya aşağı yönde regüle edildiği, kiminin ise tüm yaşam dönemlerinde belli seviyelerde sentezlendiği belirlenmiştir (Weir W, yayınlanmamış veri). Bu çalışmada Sudan izolatlarında (Shambai ve Umbaneai) görülen dominant bantların daha yüksek moleküler ağırlıkta ( $\approx 47.5$  kDa) ve farklı yoğunluklarda oluşu hem aynı izolattan köken alan klonlar arasında hem de farklı bölgelerden izole edilen şuşlar arasında genetik ve/veya transkripsiyonal düzeyde ya da konak bağışıklık sisteminine bağlı farklılıklardan kaynaklanmış olabilir. Merozoit yüzey proteini olan Tams'ı kodlayan genlerdeki farklılığın coğrafik konumla ilişkilendirilemeyeceği (Gubbels ve ark 2000, Katzer ve ark 1998) belirtilmiştir. Bununla birlikte, merozoit yüzey proteinlerinde görülen farklılıkların sığır bağışıklık sisteminden korunma amacıyla meydana gelebileceği ve muhtemel immün seleksiyona bağlı olarak şekillendiği düşünülmektedir (Hall ve ark 2005, Gubbels ve ark 2001). Bu da bize farklı coğrafik bölgelerde yer alan parazit populasyonlarının gerek vektörel düzeyde görülen genetik rekombinasyon ve buna bağlı farklı genotiplerdeki transkripsiyonal değişimler gerek endemik stabil bölgelerde hayvanlar arasında görülen vektörel bulaşma oranının yüksek oluşu ve gerekse de farklı hayvanlar arasında parazite karşı gelişen bağışık yanıtın çeşitlilik göstermesine bağlı şekillenebileceğini düşündürmektedir. Ancak tüm bu değişkenlerin ayrı ayrı incelendikten sonra bir araya getirilerek son bir değerlendirme yapılması gerekliliği unutulmamalıdır.

D7 hücre kültürlerinden hazırlanan ham ekstraktlarda Western blotlamada görülen immunodominant protein bantlarının alt hücrel fraksiyonlardaki dağılımı incelendiğinde özellikle  $\approx 32$  kDa moleküler ağırlığa sahip olan protein bantının hücrenin membran ve membran organellerini içeren fraksiyonda biraz daha yoğun olmak kaydıyla, nükleik asit ve sitoskeletal organellerin bulunduğu fraksiyonlarda da görülmüştür. Belirlenememiş olan bu proteininin fonksiyonel olarak oldukça aktif olduğunu düşündürmektedir. Bu bantın nükleik

asit fraksiyonlarında da görülmesi protein ile ilgili farklı fonksiyonları akla getirmektedir. Tropikal theileriosis'de enfekte konak hücrelerde meydana gelen klonal bölünme makroşizontların varlığına bağlıdır, buparvaquone vb. ilaçlarla parazitin yok edilmesi sonucunda konak hücre bölünmesi durmakta ve apoptotik hücre ölümü meydana gelmektedir (McHardy ve Morgan 1985, Dobbelaere ve ark 1988, Fich ve ark 1998). Konak hücre parazit arasındaki ilişkinin belirlenebilmesi için yapılan çalışmalar *Theileria* ile enfekte hücrelerde transkripsiyon faktörü NFκK (Ivanov ve ark 1989); AP-1 (Baylis ve ark 1995); interleukin 2 (IL-2) ve IL-2 reseptörü (IL-2R) (Dobbelaere ve ark 1988; Heussler ve ark 1992) ile kazein kinaz II (Ole Moiyo ve ark 1993) gibi konak hücre düzenleyici mekanizmalarında değişimler meydana geldiğini göstermiştir. Bu mekanizmalarda rol alan bazı değişimlerin direk yada dolaylı olarak parazit tarafında kodlanan ve konak hücre çekirdeğine taşınan, AT motifleri gibi kimi özgül peptid motifleri içeren proteinler tarafından oluşturulabileceği (Shiels ve ark 2004, Swan ve ark 2001) ileri sürülmüştür. Her ne kadar ≈32 kDa moleküler ağırlığa sahip proteinin identifikasyonu yeterli zaman olmadığından dolayı yapılamamış olsa da proteinin parazit aracılı klonal bölünmedeki muhtemel rolü göz ardı edilmemelidir. Bunun yanında ham ekstraktlar kullanılarak yapılan çalışmalarda proteinlerin hücreye özgü kompartımanlar içerisinde yer alması yada amino asit diziliminde ER, golgi aygıtı veya mitokondrial motifler bulunması hücre içinde fonksiyonel olarak farklılık göstermesine yol açabilmekte ve bu tür proteinlerin izolasyonu dolayısıyla fraksiyonel dağılımının değişebileceği de unutulmamalıdır (Holden ve Horton 2009). ≈32 kDa büyüklüğündeki proteine ait amino asitler üzerinde bulunabilecek muhtemel peptid motifler ya da denemede oluşabilecek muhtemel aksaklıklara bağlı olarakta alt hücresele fraksiyonlardaki dağılım değişebilmektedir. Bu nedenle ilgili proteinin hangi hücresele fraksiyonda yer aldığı kesin olarak belirlenebilmesi için daha ayrıntılı bir çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte elde edilen sonuçlar doğrultusunda ≈32 kDa ağırlığındaki proteinin *T. parva* ve *T. lestoquardi* gibi farklı türler ile *T. annulata*'da ortak olarak görülmesi bu proteinin hem farklı izolatlar hemde farklı türler arasında çapraz koruma oluşturma ihtimalini akla getirmektedir.

Bu çalışmada biyoinformatik analizler ile yapılan değerlendirmeye sonrası üretilen ve daha önceki çalışmalarda belirlenen rekombinant proteinler kendilerine karşı enfekte hayvanlarda oluşan antikor yanıt yönünden Western blotlama ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak yapılan biyoinformatik analizlerin immonojenik özellik taşıyabilecek proteinlerin belirlenmesinde kullanılabilecek faydalı bir yöntem olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında her ne kadar antijenlerin belirlenmesinde kullanılan biyoinformatik

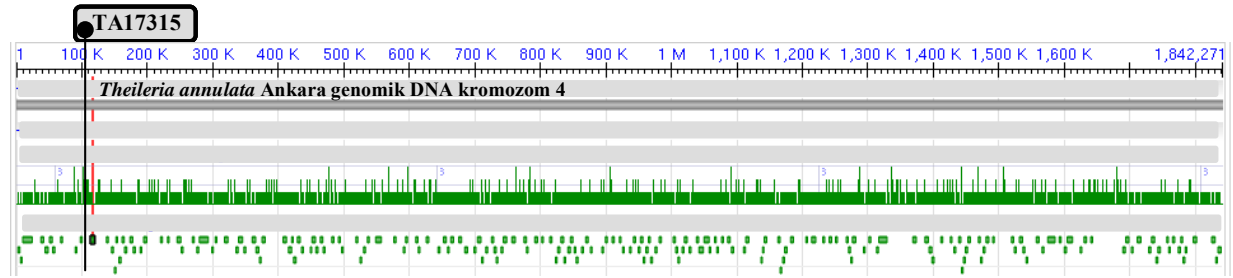


programlar çok önemli avantajlar sağlasa da bunların deneysel çalışmalar olmadığı ve elde edilen verilerin mutlaka fonksiyonel olarak incelenmesi gerektiği unutulmamalıdır.

Yapılan analizler sonucu elde edilen bulgulara (TA06510) göre signal peptid (SP), membran bağlanma alanı (TMD), GPI bağlayıcılar, EST verileri, dN/dS oranları gibi parametrelerin genomda yer alan muhtemel antijenlerin belirlenmesinde kullanılabileceği görülmüştür. Önceki çalışmalarda belirlenen TaSP (Schnittger ve ark 2002), Tams-1 (Glascodine ve ark 1990) ve Tams-2 (Dickson and Shiels 1993c) proteinlerine karşı gelişen antikor yanıt her ne kadar biyoinformatik yolla belirlenen TA06510 proteini nazaran daha yüksek olsa da bu proteinin immunojenik özellik gösterdiği göz ardı edilmemelidir. Bunun yanında *T. annulata* ile enfekte makroşizont hücrelerden hazırlanan protein ekstraktlarında Western blotlamalarda görülen dominant bantların belirlenmesi ve PIM ortoloğu olan 42kDa'luk immunodominant makroşizont antijeni TaSP (Schnittger ve ark 2002) hakkında ayrıntılı bilgi ile bu proteinin blotlamalarda görülen dominant bantlardan biri olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma bir sonraki kısımda anlatılmıştır.

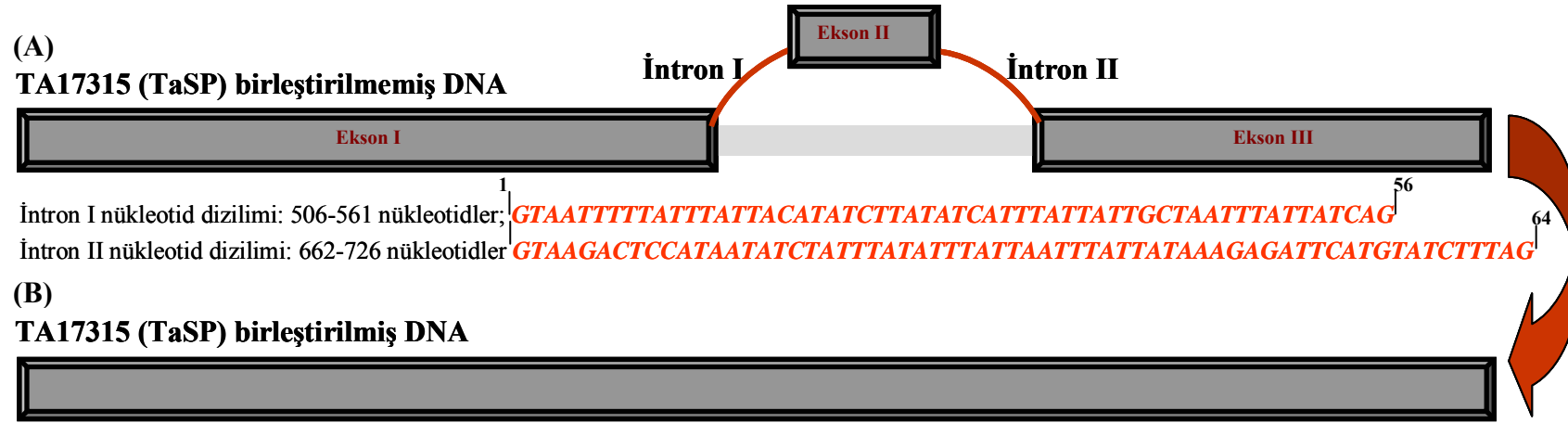
## 2.B. TaSP Molekülünün İmmunodominat Makroşizont Antijeni Olup Olmadığının Belirlenmesi ve İmmunodominant Bantların Tanımlanması

TaSP proteini, şizontlara karşı geliştirilmiş antiserum kullanılarak *T. annulata* cDNA kütüphanesinin incelenmesi sonucunda tanımlanmış, parazite ait sporozoit ve şizont dönemlerinde sentezlenen, haploid parazit genomunda tek kopya halinde bulunan bir gen tarafından kodlanan bir proteindir (Schnittger ve ark 2002). Proteinini kodlayan TA17315 geni dördüncü kromozom üzerinde bulunan (Şekil 2.B.1), sırasıyla 505, 98 ve 342 bp uzunluklarında üç ekson (Ekson I, II ve III) ile yine sırasıyla 56 ve 64 bp uzunluğundaki iki intronik bölgeden (intron I ve II) oluşan toplam 1065 bp uzunluğunda birleştirilmemiş DNA içeren bir gendir. TaSP proteinini kodlayan birleştirilmiş gen bölgesi ise toplamda 945 bp uzunluğundadır (Şekil 2.B.2).



Şekil 2.B.1. TaSP proteinini kodlayan TA17315 geninin *T. annulata* Ankara izolatının genomik DNA'sına ait dördüncü kromozomu üzerindeki yerleşim yeri.

TA17315 geninin birleştirilmiş DNA'sı tarafından kodlanan *T. annulata* yüzey proteini (TaSP), toplam yükü negatif (- 17.5), 314 amino asitten oluşan, 34.5 kDa ağırlığında, asidik izoelektrik noktaya sahip (IP: 4.5) bir proteindir (<http://www.genedb.org/genedb>). N terminalinde yer alan 20 amino asitten oluşan (1-20 aa) signal peptid proteinin salgısal yapıda olduğunu, C terminal kısma yakın amino asitlerde yer alan üç membran bağlanma motifide (204–226, 247–269 ve 274–296. amino asitler) proteinin yüzey proteini olabileceğini göstermektedir. Ayrıca 26–124. amino asitler arasında yüzey proteini olduğunu gösteren peptid motifi yer almaktadır. Bunlara ilave olarak, proteinin 184–256 ve 240–288. amino asitleri arasında Ctr bakır taşıyıcı ailesine mensup proteinlerle benzerlik gösteren ve istatistiksel olarak anlamlı bulunan ( $3.3e-23$ ) alan bulunmaktadır (Şekil 2.B.3).



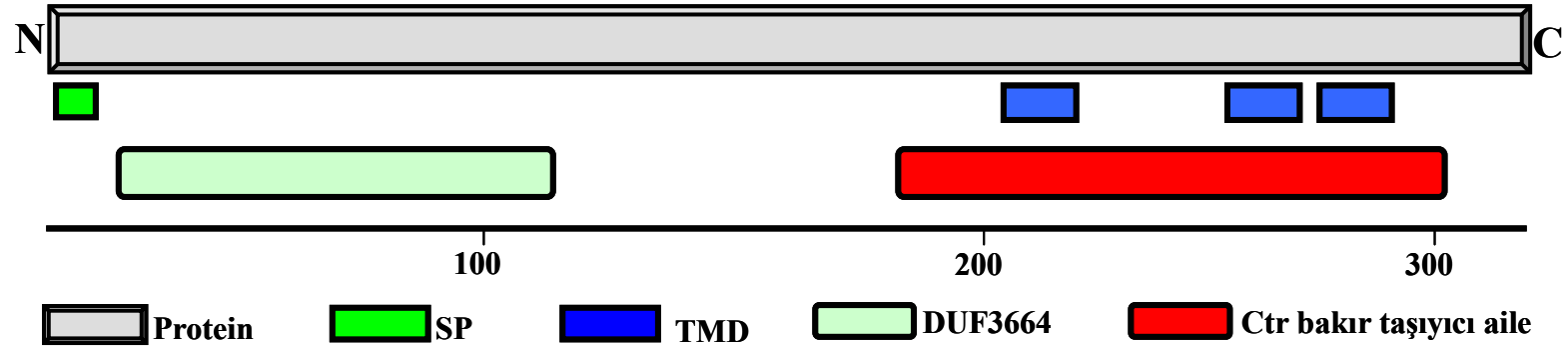
(C)  
>TA17315 (TaSP) birleştirilmiş DNA dizilimi

```

1      115      225      334      445      555      667      780      894      945      114
|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
ATGAAATTCTTCTACCTTTTTGTTCTATTTCCAATATTATTAATAATTTTGCGAATGCGGTCCATTCTTCCTTTAGATCGACAACCTAATCCTATCGATTTTGATCCCAATGAT
|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
GATCAACACCCTTTGGACCCTGATCAACTTATAGATCAAATTGAACCTTCTGAACAACCTGCTCAACAAGAACCTATAGAACCACAACAACCAACTCAACCATCTACAGA
|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
ACCCGAAGAGTTACAACCAGAACTGTTACAGTAGAAGTTCCAGAACCCGTTACATCAGAAGAACCTAAAGAATCGGATCAAACCTGAAGAACAAAAACACGAAGAACCT
|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
GAAGCATCTCCAGCTCCTGAACCAGTTGATGAACCCGCAGTTCATGCTACTGAATCTACTCCTACTAAGGCAAGTTCAGCGGTGATGGAGCAGCTGTTTGTTCATGGAAA
|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
CATCATGATTATGACTCTGACGGTAAAGAATCTAAATCCGATCATGATAAGCGCCGAAGGATAAAAAACCATTTCGTGCCCAAGACATCGCAATGTTGTGGATCATACTT
|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
CACAAATTCATATAAAATCACTGTAGCGTTTGACTGGTGGTTATGTGACAAGCCATGGCAATACGCTCTAACATTGTTGGCCTGTTTGGCTTTTCATTATTGAGTCCATGT
|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
TTGAAGGCCTACAGAGAAGTCCTCCGTGCAAAAGCTATTAGGAGTTTTATCTTCGATTGTTTTTTGACACACCTCTTTCTCTTTTIGATTGCTTTCTGTGCTTATGCATTGGA
|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
CTTTTTACTCATGCTTGTGTAATGACCTTCAATGTTGGTGTATTCTTTGCCGTTATCACAGGCTATACTGTGGGCTACTTGGTTTCCTCATTAGCCTATTCAACTTTACGTTT
|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
TCACCCTGCCAGGTCCAGCTCTTTTTCTCGCATTAAACGAAGATTGTTGTAA

```

**Şekil 2.B.2.** TaSP molekülünü kodlayan gen bölgesinin haritası. (A); Genin üç ekson (Ekson I, II ve III) ve iki introndan (İntron I ve II) oluşan toplamda 1065 bp uzunluğundaki birleştirilmemiş formu. (B); TaSP proteini kodlayan TA17315 geninin 945 bp'dan oluşan birleştirilmiş formu. (C); TaSP proteini kodlayan TA17315 geninin nükleotid dizilimindeki intronik bölgeler ok işareti ile belirtilmiştir.



(B)

>TA17315 (TaSP) proteini dizilim haritası

```

1      20      26      124      159
MKFFYLFVLFPIILLKFCECGPFLPLDRQLNPIDFDPNDDQHPLDPDQLIDQIEPSEQPAQQEPIEPQQPTQPSTEPEELQPETVTVEVPEPVTSEEPKESDQTEEQKHEEPEASPAPEPVDEPAVHATESTPTKASSSGDGAAVCHGKHHHDYDSDGKES
160      184      204      226      247      269      274      288      296      314
KSDHDKRPKDKKPFVPKTSQCCGSYFTNSYKITVAFDWVWLCDKPWOYALTLLALFGFSLLSPCLKAYREVLRAKAIRSFIFDCFLTHLFLFLIAFCAYALDFLLMLVVMTFNVGVFFAVITGYTVGYLVSSLAYSTLRSHPARSSSFRRINEDCC

```

**SP:**1-20aa;MKFFYLFVLFPIILLKFCECG

**TMD:**204-226aa;WOYAL~~TLLALFGFSLLSPCLKAY~~,247-269aa;LFLFLIAFCAYALD~~FLLMLVVM~~ve274-296aa;GVFFAVITGYTVGYLV~~SSLAYSTL~~

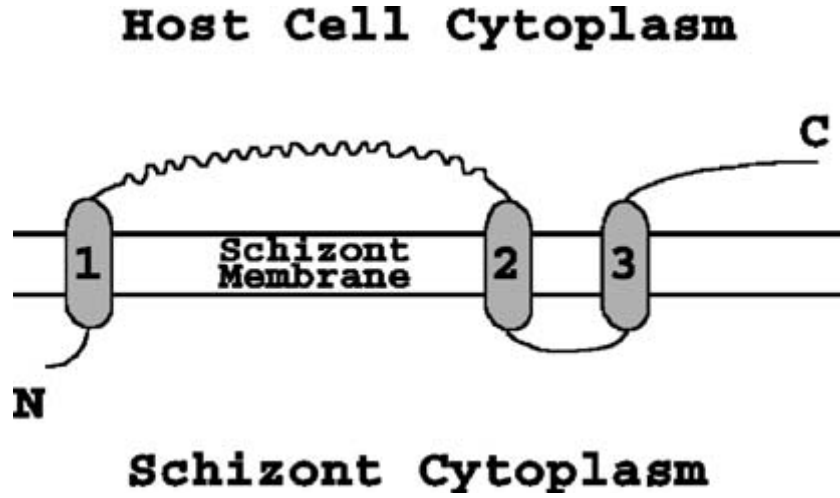
**Yüzeypoteini:**26-124aa;*DRQLNPIDFDPNDDQHPLDPDQLIDQIEPSEQPAQQEPIEPQQPTQPSTEPEELQPETVTVEVPEPVTSEEPKESDQTEEQKHEEPEASPAPEPVDEPA*

**Ctrbakırtaşıyıcıaile:**184-256aa;YFTNSYKITVAFDWVWLCDKPWOYAL~~TLLALFGFSLLSPCLKAY~~REVLRAKAIR

240-288aa;FDCFLTHLFLFLIAFCAYALD~~FLLMLVVM~~TFNVGVFFAVITGYTVGYLV

**Şekil 2.B.3.** TaSP molekülünün protein haritası. (A); TA17315 geni tarafından kodlanmış proteininin N ve C terminali arasında yer alan signal peptid (SP), üç adet trans membran alan (TMD) ile Pfam-A ailesindeki diğer proteinler ile benzerlik gösteren yüzey proteini olduğunu gösteren bölge (26-124. aa'ler arası) ve Ctr bakır taşıyıcı ailesine ait motifin bulunduğu bölgelerin (184-265 ve 240-288. aa'ler arası) protein haritası üzerindeki yerleşim yerleri. (B); 314 amino asitten oluşan, 34.5kDa ağırlıktaki TaSP molekülünün amino asit dizilimi, SP (koyu yazılı amino asitler), TMD (altı çizili, mavi italik amino asitler), yüzey protein işareti (*italik* amino asitler) ve Ctr bakır taşıyıcı aile motifleri (altı çizili siyah ve mavi amino asitler).

Proteinin membran topolojisinin belirlenmesi amacıyla TopPred (Claros ve von Heijne 1994) bilgisayar programı kullanılarak yapılan incelemelerde molekülün N terminal kısmında parazit sitoplazması, C terminalinde ise konak hücre sitoplazmasına doğru yönelmiş, birinci (1) ve ikinci (2) transmembran alanlar arasında kalan polimorfik merkezi kısmı ile konak hücre sitoplazmasıyla ilişkili olan ve toplamda üç transmembran alan içeren bir membran proteini olduğunu göstermektedir (Şekil 2.B.4) (Seitzer ve ark 2007).



**Şekil 2.B.4.** TaSP molekülünün membran topolojisinin şematik görünümü. Proteinin N terminali ve birinci membran alanı: 1–21 amino asitler arası; ikinci membran alan: 203–223 amino asitler arası; üçüncü membran alan: 261–281. amino asitler arasındaki bölgeleri göstermektedir. Birinci ve ikinci membran alan arasında kalan kısım konak hücre sitoplazması ile ilişkide olup polimorfik bir bölgedir (dalgalı kısım): 22–203. amino asitler arasında kalan kısım. İkinci ve üçüncü membran alan arasında kalan kısım şizont sitoplazması ile ilişkidir ve 224–260. amino asitler arasında kalan bölgedir. Proteine ait C terminal kısmında konak hücre sitoplazması ile ilintili olup 282–312. aminoasitler arasında kalmaktadır (Seitzer ve ark 2007).

TaSP molekülünün şizontlarla enfekte hücrelerde ki yerleşim yerinin belirlenmesi amacıyla 26–157. amino asitlerinden oluşan rekombinant kısmına (Şekil 2.B.5) karşı tavşanlarda geliştirilen antiserum kullanılarak yapılan incelemelerde proteinin parazitin dış yüzeyine yerleşmiş olduğu belirlenmiştir (Schnittger ve ark 2002, Seitzer ve ark 2007). *T.annulata* ile enfekte sekiz farklı serum kullanılarak yapılan çalışmada tüm serumların rekombinant protein ile kuvvetli reaksiyon vermiştir ve oluşan bu reaksiyon molekülün

üzerindeki B hücre epitoplarına karşı konağın geliştirdiği güçlü humoral bağışık yanıtı göstermektedir. Proteine karşı konakta görülen güçlü humoral bağışık yanıtı bakılarak molekülün *T. annulata*'nın immunodominant makroşizont antijeni olduğu ileri sürülmüştür (Schnittger ve ark 2002). *T. parva* ve *T. annulata* türleri arasında herhangi bir çağraz reaksiyon olup olmadığı belirlenmemiş, bununla birlikte Çin'de *Theileria spp.* ile enfekte küçük ruminantlarda alınan serum örnekleri kullanılarak yapılan çalışmada, serum örneklerinin çoğu hem ELISA hem de Western blot testlerinde TaSP ile çapraz reaksiyon göstermiştir ve bu sonuçlar iki tür arasında yüksek oranda benzerlikler olduğunu düşündürmüştür (Miranda ve ark 2004). Ayrıca proteinin polimorfik merkezi kısmına ait rekombinant proteinlere karşı geliştirilen antiserum ile elde edilen sonuçlara bakılarak molekülün bu kısmının konak hücre sitoplazmasına dönük olması polimorfik kısmın konak hücre doku uyuşum sistemi tarafından işlenerek enfekte hücre yüzeyinde sunuluyor olabileceğini akla getirmektedir. Bu durumun parazitin yaşam döngüsü açısından TaSP molekülünün işlevi bugüne kadar belirlenememiştir. Parazitlerin dış yüzeyinde yer alan yada konak hücre stoplazmasına salgılanan proteinler konak-parazit etkileşiminde önemli rol oynayabilecek moleküllerdir. TaSP'da parazitin dış yüzeyinde yer alan ve konak hücre sitoplazması ile ilişkili polimorfik kısmı ile konak hücre proteinleri ile etkileşim kurabilecek bir protein olarak görülmekte ve dolayısıyla konak hücre transformasyonunda rol alabileceği düşünülmektedir (Seitzer ve ark 2007). Ancak protein konak hücrede kendine karşı güçlü humoral yanıt oluşturması ve bununda molekülü ELISA gibi tanısal amaçlı testlerde kullanılabilir kılmasının dışında proteinin yukarıda belirtilen olası işlevlerine dair herhangi bir veri bulunmamaktadır.

## > TaSP

MKFFYLFVLFPIILLKFCECGPFLPLDRQLNPIDFDPNDDQHPLDPDQLIDQIEPSE  
QPAQQEPIEPQQPTQPSTEPEELQPETVTVEVPEPVTSEEPKESDQTEEQKHE  
EPEASPAPEPVDEPAVHATESTPTKASSSGDGAAVCHGKHHDYSDGKESKSD  
HDKRPKDKKPFVPKTSQCCGSYFTNSYKITVAFDWWLCKDPWQYALTLALFGFSL  
SPCLKAYREVLRAKAIRSFIFDCFLTHLFLFLIAFCAYALDFLLMLVVMTFNVGVFFAV  
ITGYTVGYLVSSLAYSTLRSHPARSSSFSRINEDCC

**Şekil 2.B.5.** TaSP molekülünün hücresel yerleşiminin belirlenmesinde kullanılan rekombinant protein dizilimi (kalın, *italik*, 12 punto) ve bunun tüm protein üzerindeki yerleşim yeri.

TaSP molekülü biyoinformatik olarak incelendiğinde, sığır MHC sınıf I (A20) molekülüne bağlandığı düşünülen 22 epitoptan sadece altısı merkezde yer alan polimorfik bölgede yerleşim göstermektedir (Schnittger ve ark 2002). Bu epitoplardan 14 adetinin korunmuş bölgelerde olması bu protein ile aşılardan sonra gelişebilecek bağışıklığın heterolog suşlarla oluşan enfeksiyonlara karşı koruma sağlayabileceğini düşündürmektedir. Ancak bununla ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

TaSP, *T. parva* genomunda bulunan polimorfik immunodominant molekülün (PIM) homoloğu olan bir proteindir. Proteini kodlayan gen bölgesinin homoloğu olan genler *T. lestoquardi* ve *Theileris spp.* (Çin) gibi diğer *Theileria* türlerinde mRNA seviyesinde sentezlenmektedir (Schnittger ve ark 2002, Bakheit ve ark 2006, Miranda ve ark 2006).

TaSP molekülüne ait amino asit dizilimi diğer *Theileria* türlerine ait dizilim ile karşılaştırıldığında türler arasında proteinin N ve C terminal kısımların yüksek oranda korunmuş bölgeler olduğu, bununla birlikte iki uç arasında kalan merkezi bölgenin oldukça farklılık gösterdiği gözlenmiştir. TaSP molekülünün merkezi kısmında gözlenen farklılığın incelenmesi amacıyla *T. annulata* Ankara (TaA) izolatından köken alan yedi farklı hücre hattı (TaA288, TaA3h4h, TaA462, TaA463, TaA139d6, TaAe3, TaAd7b12), *T. annulata* Cokoren (TaC), Tunus (TaT), Mısır (TaM) ve Hindistan (TaH) suşları birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda tümü Ankara izolatından köken alan TaA1272, TaA288 ve TaA3h4h hücre hatları sırasıyla TaA1272, TaA288 ve TaA izolatları ile özdeş olduğu belirlenmiştir. PIM proteini ile benzer şekilde *T. annulata*'nın farklı izolatlar arasında TaSP molekülünün N (ilk 37 amino asit) ve C (son 121 amino asit) terminal kesimleri yüksek oranda korunmuş iken, proteine ait merkezi kısımda yoğun amino asit yer değişimleri ve uzunluk farklılıkları

gözlenmiştir (Schnittger ve ark 2002). TaA ve TaC izolatlarına ait 18 klon arasından 11 tanesinde, 11 Tunus izolatu arasından üçünde ve yine 11 Mısır izolatından iki tanesi ile yedi Hindistan izolatu arasından birinin TaSP proteininin farklı biçimleri olduğu belirlenmiştir. Proteinler arasında polimorfizm en çok Ankara / Cokoren (11) izolatında, bunu takiben Tunus (3) ve Mısır (2) izolatlarında orta düzeyde bir farklılaşma ve en düşük polimorfizm ise Hindistan (1) izolatları arasında gözlenmiştir (Schnittger ve ark 2002). Tunus izolatları diğer bölgelerden elde edilenler ile karşılaştırıldığında en belirgin farklılığa sahip olan izolatlar olduğu görülmüştür. Benzer şekilde Sudan'ın farklı bölgelerinde elde edilen izolatlar arasında da proteinin polimorfik merkezi kısmında amino asit dizilimi düzeyinde ve uzunluk yönünden farklılıklar gözlenmiştir (Awadia ve ark 2008). Bu farklılığın mutasyon ve intragenik rekombinasyonlar sonucu geliştiği tahmin edilmektedir (Schnittger ve ark 2002).

Bu kısımda;

- i) *Theileria annulata*'nın farklı izolatlarına ait hücre kültürlerinden hazırlanan protein ekstraktları ile deneysel enfekte hayvan serumları ve TaSP antiserumu kullanılarak yapılan Western blot sonuçlarında gözlenen dominant bantlardan bir ya da bir kaçının immunodominant makroşizont antijeni olarak kabul edilen TaSP molekülü (Schnittger ve ark, 2002) olup olmadığının belirlenmesi,
- ii) Western blotlarda gözlenen diğer immunodominant bantların (Resim 2.A.1, A) tanımlanması, amaçlanmıştır.



## 2.B.1. Gereç ve Yöntem

### 2.B.1.1. Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali ve Western Blotlama

*Theileria annulata*'nın makroşizont hücre kültürlerine ait protein ekstraktlarında dominant bantların belirlenmesi ve bunlardan bir ya da birkaçının TaSP molekülü olup olmadığının araştırılması amacıyla *T. annulata*'nın 16 farklı izolatu (Ankara / D7, Ankara / TaA2, Ankara / A46, Ankara / J1 – 1, HAO, Pendik, Aydın, Diyarbakır, Yenihisar, Caceras, BAT – 2, JED–4, Umbaneai, Shambai, Gharb, Ode), *T. parva* Muguga ve *T. lestoquardi* Lahr ait makroşizont hücre kültürleri ile enfekte olmayan sığır lenfosarkoma (BL20) hücreleri kullanılmıştır (Çizelge 2.A.1). SDS–PAGE ve western blotlama çalışmalarında kullanılan protein ekstraktları belirtilen taze, *in vitro* hücre kültürlerinden hazırlanmış (Bkz.2.2.1 Gereç yöntem/ Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali ve Protein Ekstraktlarının Hazırlanması) ve testlerde kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

TaA2 ve D7 ekstraktları ile TaSP rekombinant proteinine karşı *T.annulata* Ankara sporozoit (21A, 23B, 48C ve 897A) ve *T. annulata* Ankara/Pendik yüksek pasajlı hücre kültürleri (pasaj 317) (İlhan, 1999) (54C, 891A, 32A ve 26A) ile deneysel olarak enfekte hayvanlardan elde edilen RES 42. gün serum örnekleri her hayvandan alınan örnek ayrı ayrı kullanılarak yapılan Western blotlarda oluşan bantlar, bunların moleküler ağırlıkları, farklı izolatlarda farklılık gösterip göstermedikleri ve yoğunlukları belirlenmiştir.

TaSP molekülünün polimorfik merkezi bölgesine karşı tavşanlarda geliştirilen antiserumu (birincil antikor) farklı *T. annulata* izolatları ile *T. parva* ve *T. lestoquardi* türlerinde özgül olarak bağlandığı bantların moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla 1: 10000 oranında sulandırılarak Western blotlarda kullanılmıştır. Western blot 2.2.1.5'de anlatıldığı şekilde yapılarak, oluşan reaksiyon 1: 20000 oranında dilüye edilmiş alkalin fosfat ile işaretli anti-rabbit IgG (Sigma) ikincil antikorunu kullanılarak belirlenmiştir.

### 2.B.1.2. Bağışık Serumların TaSP Rekombinant Proteini ile Bloklanması ve Western Blot

TaSP molekülünün, hücre kültürlerinden hazırlanan protein ekstraktları ile yapılan Western blotlarda gözlenen immunodominat makroşizont antijeni olup olmadığının belirlenmesi amacıyla üç membran hazırlanmıştır. Bunlardan biri; sporozoitler ile enfekte 48C numaralı hayvana ait RES 42. gün serumu 1:500 oranında bloklayıcı solüsyonu ile sulandırılmıştır. Serum membran ile muamele edilmeden önce rekombinant olarak üretilmiş 250µg TaSP proteini ile gece boyunca, + 4°C'de, çalkalmadı rotorda inkübe edilerek serumun

içerisinde bulunan TaSP molekülüne özgü antikorlar nötralize edilmiştir. İkinci membran; yukarıdaki anlatıldığı şekilde 250µg TaSP rekombinant proteini ile bloklanan RES 42. gün serumu buna ilaveten ertesini gün serumuna 500µg daha rekombinant protein eklenerek (toplamda 750µg TaSP proteini) oda ısısında iki saat daha bloklanmıştır. Üçüncü membranda ise aynı serum TaSP rekombinant proteini ile bloklanmadan (kontrol) 1:500 oranında bloklayıcı solüsyonu içerisinde dilüye edilerek kullanılmıştır. Serumlarla inkübasyonu takiben membranlar üçer kez yıkama solüsyonu ile beşer dakika boyunca yıkanmıştır. Daha sonra her üç membranda oluşan reaksiyon bloklayıcı solüsyonu içerisinde 1:20000 oranında dilüye edilmiş alkalen fosfataz ile işaretli antibovine IgG (Sigma) ikincil antikorunu ile bir saat inkübe edilmiştir. Oluşan reaksiyon BCIP/NBT kullanılarak belirlenmiştir (Bknz. Bölüm 2.2.1.5).

### **2.B.1.3. Bağışık Serum ile İmmunopresipitasyon ve Proteomiks Analizleri**

Western blotlarda gözlenen immunodominant bantların belirlenmesi amacıyla sporozoit ile enfekte hayvanlardan elde edilen RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan immunopresipitasyon yönteminde ilk olarak D7 hücrelerinden protein ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu amaçla taze hücre kültürlerinin 14 ml'lik flakslara konularak 1500 devirde, beş dakika boyunca +4°C'de santrifüj edilerek dipte toplanması sağlandıktan sonra üç kez PBS ile yıkanarak aynı devirde santrifüj edilmiş ve en son yıkamayı takiben dipte toplanan hücreler buz üzerine konularak bekletilmiştir.  $2 \times 10^6$  hücre/ml üzerine içerisinde 100µl proteaz inhibitörü (Mamalian Cell Coctail, Sigma) içeren taze hazırlanmış 10 ml'lik tampon solüsyondan (1ml 1.5 M NaCl, 1ml 500 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1ml %10 Triton X-114, 1ml %5 Na deoksikolat, 6ml deiyonize su) gerekli miktarda eklenerek buz üzerinde 10 dakika boyunca lize edilmişlerdir. Bunu takiben lize olmamış olan hücrelerin tamamıyla parçalanması amacıyla altı kez 10'ar saniye sonikasyona (her 10 saniyeden sonra 10 saniyelik bekleme süreleri olacak şekilde) beş amplitütde sonikasyona tabi tutulmuşlardır. Daha sonra çözülmeyen hücre partiküllerinin dipte toplanması için 14000 devirde, 30 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edilmiş ve proteinleri içeren üstteki kısım yeni bir tüpe aktarılarak immunopresipitasyonda kullanılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Sporozoit ile enfekte hayvanlardan elde edilen RES 42. gün serumunda bulunan IgG'ler immunopresipitasyonda kullanılmak amacıyla Pierce® Thiophilic Adsorbent (Thermo Scientific, America) sistemi yardımı ile purifiye edilmişlerdir. Bu amaçla; ilk olarak bir ml serum içerisine 87 mg potasyum sulfat (0.5 M) karıştırılarak eritilmiş ve karışım 10000xg'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Üst kısımda toplanan sıvı pipetle alınarak 0.5 µm'lik filtrelerden geçirilip kullanıma hazır hale getirilmiştir. Daha sonra bu sıvı, önceden oda ısısına

getirilerek dengelenen ve 12 ml bağlanma solüsyonu (0.5M potasyum sulfat, 50mM sodyum fosfat, pH 8.0, %0.05 Na azid) ile yıkanarak hazır hale getirilen thiophilic absorbent kolon içerisine konularak IgG'lerin bağlanması sağlanmıştır. Daha sonra kolon 15 ml bağlanma solüsyonu ile yıkanarak serumda bulunan bağlanmamış maddelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bunu takiben bağlı IgG 18 ml elüsyon solüsyonu (50mM sodyum fosfat, pH 8.0, %0.05 Na azid) ile temiz ependorflara birer ml elüye edildikten sonra her elüsyonda bulunan protein konsantrasyonu spektrofotometrik yolla ölçülmüştür.

Elde edilen purifiye IgG'ler immunpresipitasyonda kullanılmadan önce ProteoExtract® Protein Presipitasyon Kiti (Calbiochem, İngiltere) ile reaksiyonu inhibe edebilecek bileşenlerden temizlenerek, konsantre hale getirilmiştir. Bu amaçla; yukarıda anlatıldığı şekilde purifiye edilen IgG elüsyonlarından 200µl alınarak üzerine 800 µl presipitasyon solüsyonu eklenip vortekslenildikten sonra -20°C'de 20–60 dakika proteinlerin çökmesi için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun bitiminde karışım oda ısısında, 14000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve üstte toplanan sıvı uzaklaştırılmıştır. Bu işlemden sonra dipteki pellet üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek vortekslenmiştir. Daha sonra oda ısısında, 14000 devirde iki dakika boyunca santrifüj edilmiş ve üstte toplanan yıkama solüsyonu uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi iki kez tekrar edilmiştir. Yıkama işlemi takiben pellet oda ısısında 5–60 dakika bekletilerek kurutulmuş ve daha sonra 400 µl 0.1 M borat tampon solüsyonu, pH 9.5 ile sulandırılmıştır. Böylece pürifiye edilip, temizlenen IgG'ler immunpresipitasyonda kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Bantların immunpresipitasyon yöntemi ile belirlenmesinde poliüretan bir katmanla kaplı, animo ya da sülfidril grubu ihtiva eden proteinler ya da diğer bağlayıcılarla kovalent olarak bağlanmasını sağlayan tosyl grupları içeren, 2.8 µm'lik biyomanyetik seperasyon amaçlı süpermanyetik, polistiren boncuklardan oluşan katı faz Dynabeads®M-280 Tosylactivated (Dyna®Biotech, İnvitrogen) sistemi kullanılmıştır. İmmunoresipitasyon işlemine başlamadan önce bir dakika boyunca, köpük oluşturmadan çalkalanarak süspanse edilen dynabead'lerden 200µl ( $4 \times 10^8$  boncuk) alınarak 1.5 ml'lik temiz ependorf tüplere aktarılmıştır. Daha sonra tüp miknatısa (Dyna MPC) konularak iki dakika boyunca boncukların miknatıs tarafından tutulmaları beklenmiştir. Türün bir kenarında toplanan boncuklara dokunulmadan geriye kalan sıvı kısım pipet yardımı ile uzaklaştırıldıktan sonra tüp miknatıstan uzaklaştırılarak 400 µl tampon solüsyon B (0.1M borat, pH 9.5) eklenip iki dakika vortekslenerek yıkanmıştır. Yıkama işlemi iki kez tekrar edilerek dynabead'ler proteinler ile kaplanmaya hazır hale getirilmiştir. Daha sonraki aşamada,  $4 \times 10^8$  magnetik boncuk homojen halde dağıtmak için bir dakika vortekslenmiş ve önceden anlatıldığı şekilde

pürifiye edilip, temizlenen IgG'lerden 400 µl (300µg) alınarak dynabead'lerin üzerine eklendikten sonra tekrar bir dakika süreyle vorteklenmiş ve 24 saat, 37°C'de inkübe edilerek IgG'lerin boncuklara bağlanması sağlanmıştır. İnkübasyonun bitiminde tüpler tekrar mıknatısa konularak iki dakika boyunca dynabead'lerin tüpün mıknatısla temasta olan yüzünde toplanması için bekletildikten sonra geriye kalan sıvı kısım pipetle uzaklaştırılmıştır. Daha sonra IgG'ler ile bağlanmış haldeki dynabead'ler dört kez yıkanmıştır. Bu yıkamalardan, ilk ikisi 800 µl tampon solüsyon C (PBS; 88 g NaCl, %0.1 Bovine Serum Albümin (BSA) + 100 ml 0.01 M Na – fosfat, pH 7.4) ile beşer dakika boyunca +4°C'de, üçüncüsü serbest tosyl gruplarının bloklanması amacıyla 800 µl tampon solüsyon D (0.2 M Tris, pH 8.5, %0.1 BSA) ile 24 saat boyunca 20°C'de ve dördüncüsünde 800µl tampon solüsyon C ile beş dakika boyunca +4°C'de yapılmıştır. Son yıkama işleminden sonra IgG'ler ile kaplanarak kullanıma hazır hale getirilen dynabead'ler protein pürifikasyon işlemine kadar 100 µl tampon solüsyon C ile sulandırılarak +4°C'de saklanmıştır. En son aşamada ise IgG ile kaplı dynabead'ler mıknatıs yardımı ile içerisinde tutulduğu tampon solüsyon C'den ayrılmış ve önceden anlatıldığı şekilde hazırlanan D7 hücre ekstraktlarından eklenerek 2–8°C'de, 20 saat boyunca inkübe edilerek ekstraktta bulunan IgG özgü proteinlerin bağlanmaları sağlanmıştır. İnkübasyon sonrasında tüpler mıknatısa yerleştirilerek dynabeadler sıvı kısımdan ayrılmış ve bunu takiben dynabead'ler üç kez PBS tampon solüsyonu ile her yıkama 10 dakika olacak şekilde +4°C' de yıkanmıştır. Yıkama işleminin sonrasında pürifiye edilmek istenen proteinler farklı elüsyonlar (DTT'li veya DTT'siz 1xSDS, 2xSDS, 0.1xSDS, ≥1M NaCl, pH 8.4, 0.1M glicin HCl, pH 2.8, %1 TritonX–100, 8M üre, 100mM trietilenamin ve 30mM Na–sitrat) kullanılarak elüye edilerek farklı tüplerde toplanmış ve Western blot yapıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Daha sonra istenilen proteinlerin pürifiye edilip edilemedikleri, sporozoit ile enfekte hayvanlardan elde edilen RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan Western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla eş zamanlı olarak aynı jelde (midi jel) eşit koşullar altında yapılan SDS–PAGE elektroforezi sonrası jelin yarısı steril bistüri ile kesilerek %40 metanol ve %10 asetik asit içerisinde hazırlanmış %5 Commassie Blue G250 (Sigma) ile bir saat boyunca boyanmıştır. Boyamayı takiben jel %40 metanol ve %10 asetik asit içerisinde bantlar görünene kadar (her 20 dakika bir solüsyon yenilenmiştir) boyasından arındırılmış ve bantlar görünmeye başlayınca solüsyon dökülerek jel steril deiyonize suda bekletilmiştir. Jelin diğer yarısı ise midi blotlama tankında Western blot için kullanılmıştır. Blotlama sonrası istenilen proteinlere ait bantları içeren membran ile Commassie Blue G250 ile boyalı membran bir birleri ile karşılaştırılarak identifiye edilmek istenen protein bantı boyalı jelden steril bistüri

yardımı ile kesilerek steril ependorf tüpe aktarılmıştır. Örnekler proteomiks analizi için Glasgow Üniversitesi bünyesinde yer alan Wellcome Merkez Laboratuvarına mass spektrofotometrik yöntemle sekans analizlerinin yapılması amacıyla gönderilmiştir. Mass spektrofotometrik analizler sonucunda elde edilen protein hitinin biyoinformatik incelemesi sonucunda bu proteininde içerisinde yer aldığı paralog gen ailesinde yer alan toplam TA15685, TA15690, TA15695, TA15705 ve TA15710 genleri tarafından kodlanan proteinler belirlenmiştir. Ta9 ve paralog gen ailesi tarafından kodlanan proteinler Gateway Teknoloji (İnvitrogen) kullanılarak pDEST17 vektörü içerisine klonlanmış (Bknz. Bölüm 2.2.1.3/Belirlenen Proteinleri Kodlayan Gen Bölgelerinin Klonlanması) ve bunu takiben BL21–A1 hücrelerine transforme edilerek L–arabinoz ile indüklenerek üretildikten sonra denatüre koşullar altında affinite kromatografi yöntemi kullanılarak pürifiye edilmişlerdir. Paralog genlerin klonlanmasında kullanılan ileri ve geri yönlü *attB* adaptörlü primer çiftleri Çizelge 2.A.3’de gösterilmiştir.

Daha sonra rekombinant proteinlere karşı gelişen antikor yanıt Western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca TA15705 ve TA15710 rekombinant proteinlerinin D7 hücre ekstraktlarında görülen dominant bantlardan hangisi olduğunun anlaşılması amacıyla yukarıda bahsedildiği şekilde (Bknz. 2.3.1.2. Bağışık Serumların TaSP ile Bloklanması ve Western Blotlama) bloklama deneyi yapılmıştır.

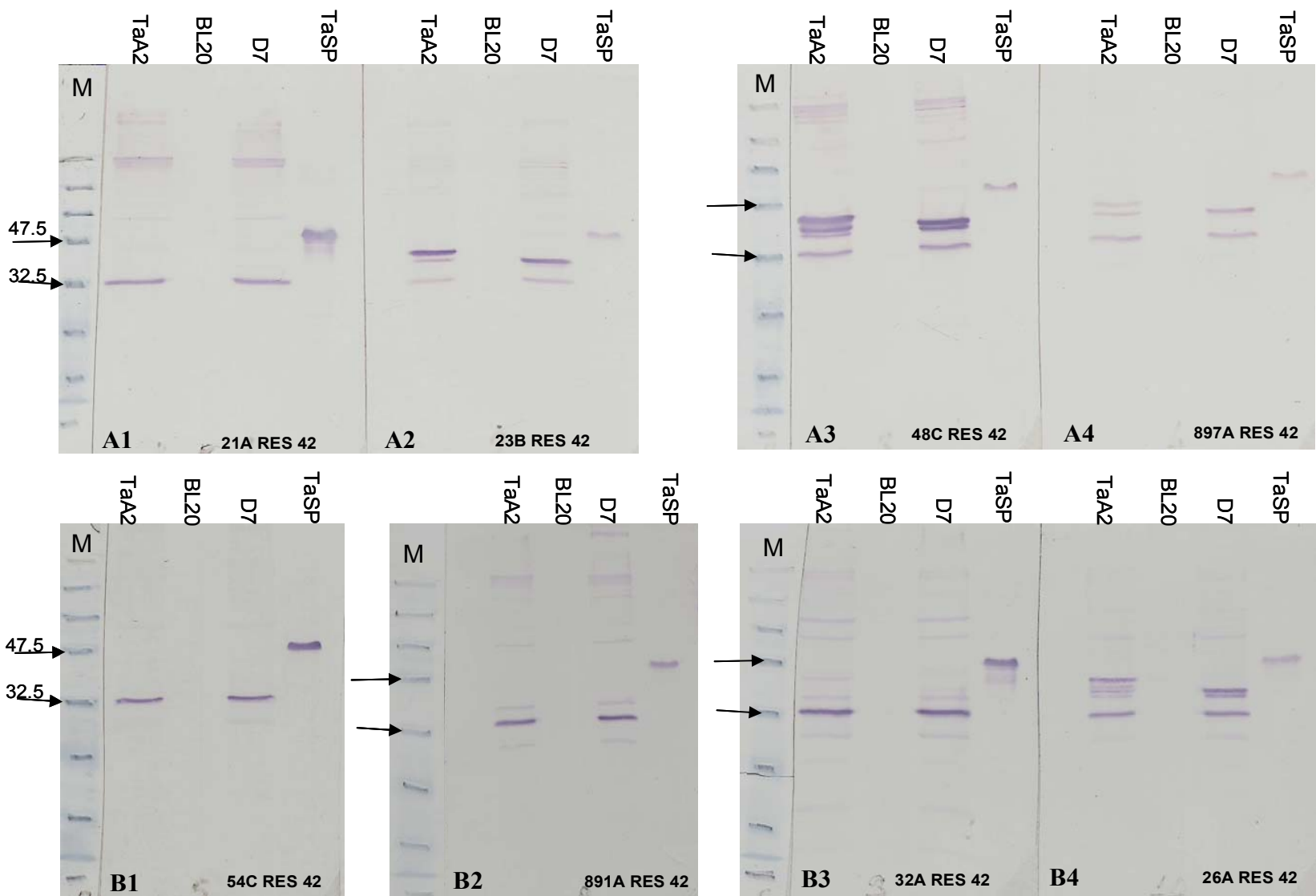
## 2.B.2. Bulgular

### 2.B.2.1. Bağışık Serumlar ve Anti-TaSP Antikoru ile Elde Edilen Western Blotlama Sonuçları

TaA2, D7 ekstraktlarında belirlenen bantların karşılaştırılması ve TaSP rekombinat proteinine karşı gelişen yanıtın *T. annulata* Ankara sporozoit (21A, 23B, 48C ve 897A) ve *T.annulata* Ankara/Pendik yüksek pasajlı hücre kültürleri (54C, 891A, 32A ve 26A) ile deneysel olarak enfekte hayvanlardan elde edilen RES 28–42. gün serum örnekleri her hayvandan alınan örnek ayrı ayrı kullanılarak yapılan Western blot sonuçları Resim 2.B.1’de gösterilmiştir.

21A, 23B, 48C ve 897A no’lu hayvanlarda sporozoit ile enfeksiyonu takip eden yedinci ayda *T.annulata*/Gharb suşuna ait sporozoitler kullanılarak oluşturulan re enfeksiyondan sonraki 42. günde toplanan serum örnekleri kullanılarak yapılan western blotlamalar da TaSP rekombinant proteine karşı en iyi antikor yanıt 21A no’lu hayvan da gözlenmiştir (Resim 2.B.1, A1). 48C, 23B ve 897A no’lu hayvan serumlarında TaSP molekülüne karşı oluşan antikor yanıtın 21A’ya nazaran giderek azalmış ve en düşük antikor yanıt 891A’da görülmüştür (Resim 2.B.1, A4). Bunun yanında sporozoit ile enfekte hayvanların tümünde RES 42. gün serumu *T. annulata* Ankara izolatına ait klonlanmamış TaA2 ve tek klon D7 ekstraktlarında  $\approx 32$  kDa ağırlığındaki ortak bantı hemen hemen eşit oranda belirlerken, TaSP molekülüne karşı en yüksek düzeyde antikor yanıtın gözlemlendiği 21A serumu ile yapılan blotlamalar sonucunda ortak bant haricinde diğer bantların oldukça zayıf olduğu görülmüştür (Resim 2.B.1, A1). 23B’ye ait RES 42. gün serumu ortak banta ek olarak, klonlanmamış TaA2 ekstraktlarında  $\approx 42$  kDa ağırlığında bir ve bundan biraz daha düşük moleküler ağırlığa sahip ikinci bir bant daha belirlenmiş, D7 ekstraktlarında ise sadece TaA2’ye benzer şekilde  $< 42$  kDa ağırlığında bir bant görülmüştür. (Resim 2.B.1, A2). 48C’ye ait serum örneği ile yapılan blotlamalarda TaA2 ile D7 ekstraktlarında belirgin olan, yaklaşık 36–40 kDa aralığında iki bant daha gözlemlenirken, TaA2 ekstraktlarında bu iki banta ilaveten  $\approx 42$  kDa ağırlığında üçüncü bir bant daha görülmüştür (Resim 2.B.1, A3). 897A no’lu hayvandan alınan RES 42. gün serumu ile yapılan incelemelerde ise diğer hayvan serumlarına benzer şekilde D7 ekstraktlarında ortak bantla birlikte sadece bir bant ( $\approx 40$  kDa) daha görülürken, TaA2 ekstraktlarında hem  $\approx 40$  kDa hemde  $\approx 42$  kDa ağırlığında iki bant görülmüştür. 897A serumu ile belirlenen bantlar, sporozoit ile enfekte diğer hayvan serumları ile belirlenen bantlar ile benzer moleküler ağırlığa sahip olmalarına karşın bunlara nazaran blotlamada daha az belirgin reaksiyon vermişlerdir (Resim 2.B.1, A4).

Attenüye hücre kültürü *T. annulata* Ankara/Pendik (pasaj 367) ile enfekte 54C, 891A, 32A ve 26A no'lu hayvanların enfeksiyonu takip eden yedinci ayda *T. annulata* Gharb suşuna ait sporozoitler kullanılarak oluşturulan re enfeksiyondan sonraki 42. günde toplanan serum örnekleri kullanılarak yapılan Western blotlarda TaSP rekombinant proteine karşı en iyi antikor yanıt 54C ve 32A no'lu hayvan serumları ile elde edilmiştir (Resim 2.B.1, B1 ve B3). 891A ve 26A no'lu hayvanlara ait serumlarda ise TaSP molekülüne karşı oluşan yanıt biraz daha az olmasına karşın sporozoit ile enfekte hayvanlarda ait 23A, 48C ve 897A serumlarına nazaran daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir (Resim 2.B.1, B2 ve B4). Tüm hayvanlara ait RES 42. gün serumları ile yapılan blotlamalarda TaA2 ve D7 ekstraktlarının her ikisinde de  $\approx 32$  kDa ağırlığındaki ortak bant belirgin olarak görülmektedir. Bununla birlikte *T.annulata* Ankara sporozoitleriyle enfekte hayvanlarında 36–40 kDa aralığında görülen dominant bantlar sadece 26A no'lu hayvana ait serumu ile belirlenirken (Resim 2.B.1, B4), diğer hayvanlara (54C, 891A ve 32A) ait serumlarla yapılan blotlamada aynı moleküler ağırlık aralığındaki bantlar 54C ile hiç belirlenemez iken (Resim 2.B.1, B1), 891A' da  $<36$  kDa ağırlığında bir bant, 32A no'lu hayvan serumuyla da  $<36$  kDa ağırlığında bir, 36–42 kDa aralığında ise iki olmak üzere üç tane zayıf bant görülmüştür (Resim 2.B.1, B2 ve B3). Yüksek pasajlı hücre kültürleri enfekte edilen tüm hayvanlara ait RES 42. gün serumlarında  $\approx 30$  kDa ağırlığında bir bant daha gözlemlenmiş ve bu bant özellikle 54C ve 891A no'lu hayvan serumlarında belirgin olarak görülmüştür (Resim 2.B.1, B1 ve B2). 32A no'lu hayvan serumunda TaA2 ve D7 ekstraktlarında yaklaşık 30 kDa ağırlığındaki bu banta ek olarak  $\approx 20$  kDa ağırlığında diğer bir bant da göze çarpmakta, 26A'da ise bu bant çok az belirgin olarak görülmektedir. Görülen bu bantlardan başka 60–64 kDa aralığında az belirgin iki bant daha görülmüş ve bu iki bantın özellikle 32A no'lu hayvana serumu ile yapılan Western blotlar da diğer hayvan serumlarına oranla daha belirgin olduğu görülmüştür (Resim 2.B.1, B3).



Resim 2.B.1. (*Devam*)



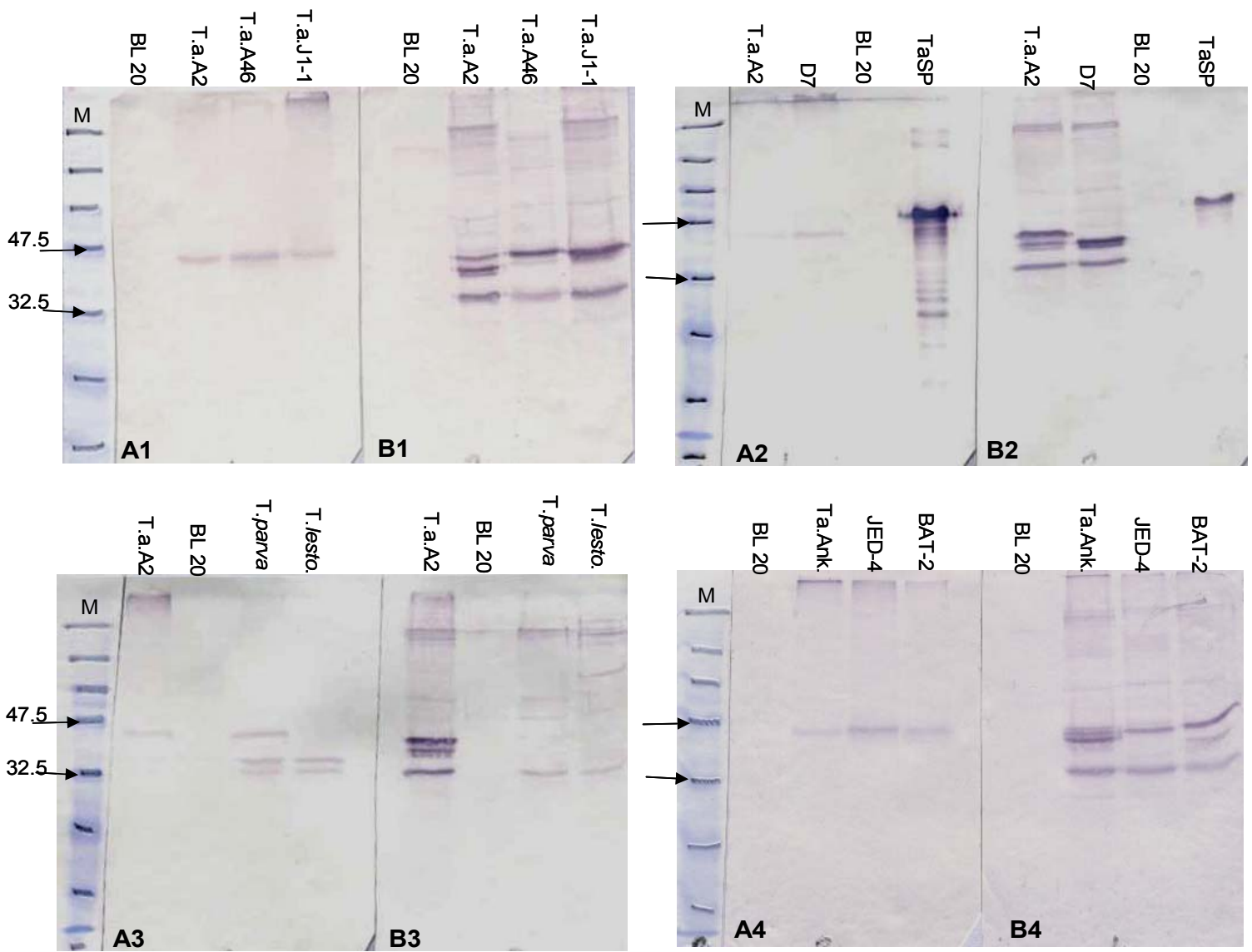
**Resim 2.B.1.** *Theileria annulata* Ankara sporozoit (21A, 23B, 48C ve 897A) ve *Theileria annulata* Ankara/Pendik yüksek pasajlı hücre kültürleri (pasaj 367) (54C, 891A, 32A ve 26A) enfekte hayvanlardan elde edilen RES 42. gün serum örnekleri kullanılarak yapılan Western blotlarda TaA2, D7 ekstraktlarında belirlenen bantların karşılaştırılması ve TaSP rekombinat proteinine karşı hayvanlarda görülen yanıtın incelenme sonuçları. (A1, 2, 3 ve 4); sporozoitler ile enfekte edilmiş 21A (A1), 23B (A2), 48C (A3) ve 891A (A4) no' lu hayvanlardan RES 42. günde toplanan serum örnekleri, (B1, 2, 3 ve 4); yüksek pasajlı hücre kültürleri enfekte edilmiş 54C (B1), 891A (B2), 32A (B3) ve 26A (A4) no'lu hayvanlardan RES 42. günde toplanan serum örnekleri. M; moleküler protein belirleyici (Bio – Rad, İngiltere).

TaSP molekülünün polimorfik merkezi bölgesine karşı tavşanlarda geliştirilen özgül antiserum ve hücre ekstraktlarındaki dominant bantları belirleyen sporozoit ile enfekte 48C nolu hayvanın RES 42. gün serum örneği kullanılarak molekülün farklı *T. annulata* izolatları ile *T. parva* ve *T. lestoquardi* türlerinde özgül olarak bağlandığı bantlar Western blot yöntemi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. *T. annulata* Ankara izolatına ait klonlanmamış TaA2 ve klonal TaA46 (klon 6), Ta J1-1 ile tek klon olan D7 ekstraktlarında TaSP antiserumu ile yapılan Western blotlar da  $\approx 42$  kDa ağırlığındaki bant özgül olarak belirlenirken (Resim 2.B.2, A1 ve A2), RES 42. gün serumları ile yapılan western blotlama sonucunda TaA2, TaA46, Ta J1-1 ve D7 ekstraktlarında sırasıyla 32–42 kDa aralığında sırasıyla dört ve üçer dominant bant görülmüştür (Resim 2.B.2, B1 ve B2). Bu bantlarda ilki en düşük moleküler ağırlığa sahip ( $\approx 32$  kDa) olan ve tüm izolatlarda ortak olarak gözlenen bant olmuştur. En üstte belirlenen bant TaA46 ve Ta J1-1 ekstraktlarında TaSP antiserumu ile yaklaşık aynı moleküler ağırlığa sahipken, TaA2 ve D7 ekstraktlarında RES 42.inci gün serumu ile görülen bantın TaSP antiserumu ile belirlenen  $\approx 42$  kDa ağırlığındaki banttan daha düşük ağırlığa sahip olduğu gözlenmiş, bunun yanında  $\approx 32$  ile 42 kDa ağırlığındaki sırası ile en alt ve en üstteki dominant bantın yanında TaA2 ekstraktlarında iki, TaA46, TaJ1-1 ve D7 ekstraktlarında ise birer bant daha görülmüştür (Resim 2.B.2, B1 ve B2).

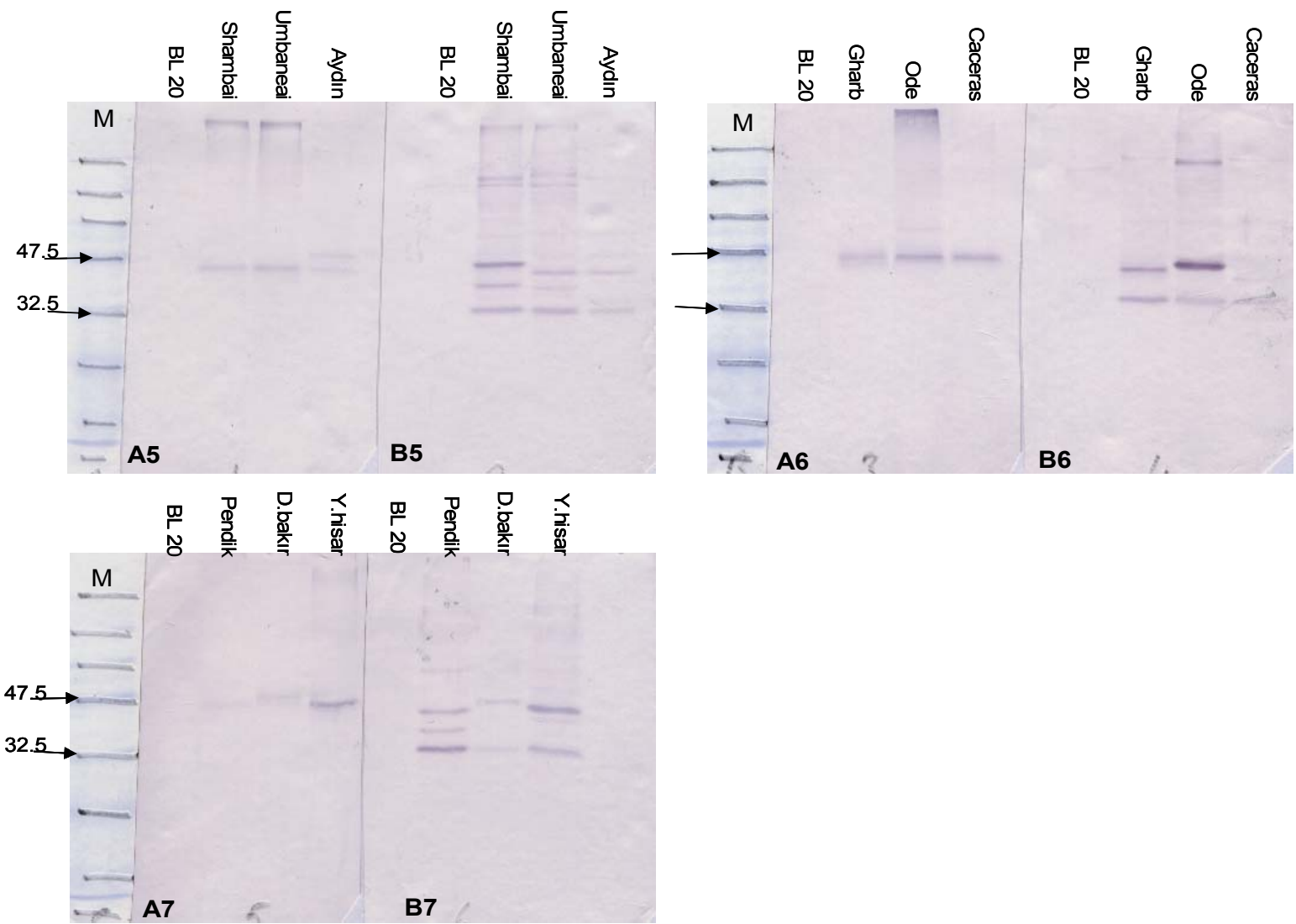
*Theileria annulata*'nın farklı coğrafik bölgelere (Sudan, Mısır, Hindistan, İspanya ve Türkiye) ait izolatları ile TaSP antiserumu kullanılarak yapılan Western blotlar da  $\approx 42$  kDa ağırlığındaki bant özgül olarak belirlenirken (Resim 2.B.2, A4, A5, A6 ve A7) sadece Türkiye' den izole edilen Diyarbakır suşunda antiserum 42 kDa'dan daha büyük moleküler ağırlığa sahip bir bant belirlenmiştir (Resim 2.B.2, A7). Bunun yanında *T. annulata* Aydın ve Gharb (Mısır) suşlarında TaSP antiserumu ile iki bant belirlenmiştir. Aydın izolatında belirlenen bantlardan biri 42 kDa ağırlığında iken bir diğerrinin ağırlığının ise  $>42$  kDa olduğu (Resim 2.B.2, A5), Gharb suşunda ise belirlenen ikinci bantı daha az belirgin ve  $<42$  kDa ağırlığında olduğu görülmüştür (Resim 2.B.2, A6). RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan Western blotlarda yukarıda belirtilen  $\approx 32$  kDa ağırlığındaki bant tüm izolatlarda görülmüştür. Ortak bantın yanında Tunus'tan izole edilen JED-4 suşunda görülen dominant bantın ağırlığı 42 kDa'dan daha düşük olurken, bir diğerr suş olan BAT-2'de ise aynı moleküler ağırlıkta (42 kDa) bir ve 42 kDa'dan daha düşük ağırlığa sahip üçüncü bir bant daha görülmüştür (Resim 2.B.2, B4). Sudan izolatları olan Shambai ve Umbaneai'de ise 42 kDa'dan daha büyük ve eşit moleküler ağırlığa sahip olan bantların yanında BAT-2 suşuna benzer şekilde 32–42 kDa aralıkta üçüncü bir bant daha belirlenmiştir (Resim 2.B.2, B5). *T. annulata*'nın İspanya izolatı olan Caceras' da ortak olan banta ( $\approx 32$  kDa) ilaveten belirlenen iki banttan birinin 42 kDa,

diğerinin ise daha düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu görülmüştür. Hindistan suşu olan Ode ekstraktında RES 42. gün serumu TaSP antiserumu ile benzer ağırlıkta bir bant oluşurken, Mısır izolatında (Gharb) oluşan bantın daha düşük moleküler ağırlıkta olduğu görülmüştür (Resim 2.B.2, B6). Türkiye izolatlarında (Aydın, Pendik, Diyarbakır ve Yenihisar) RES 42. gün serumu TaSP antiserumu ile benzer ağırlıklarda bantlar oluşturmuş, bunun yanında Pendik ve Yenihisar ekstraktlarında <42 kDa ağırlığında üçüncü bir bant daha görülmüştür (Resim 2.B.2, B5 ve B7). *T. annulata* Aydın izolatında TaSP antiserumu kullanılarak yapılan blotlamalarda görülen ikinci bantın (>42 kDa) RES 42. gün serumları ile yapılan blotlarda oldukça zayıf olduğu görülmüştür (Resim 2.B.2, B5).

TaSP molekülünün polimorfik merkezi bölgesine karşı tavşanlarda geliştirilen özgül antiserumun *T. parva* ve *T. lestoquardi* gibi farklı *Theileria* türleri ile çapraz reaksiyon verip vermediğinin araştırılması amacıyla yapılan Western blotlarda TaSP antiserumu *T. parva* ekstraktlarında 32–42 kDa aralığında üç, *T. lestoquardi* ekstraktlarında ise 32–34 kDa aralığında iki bant belirleyerek türler arasında çapraz reaksiyon vermiştir (Resim 2.B.2, A3). RES 42. gün serumu ise 34 ve 42 kDa moleküler ağırlıktaki bantları belirleyememiş ve sadece ≈32 kDa ağırlığındaki ortak bant ile çapraz reaksiyon göstermiştir (Resim 2.B.2, B3).



Resim 2.B.2. (*Devam*)



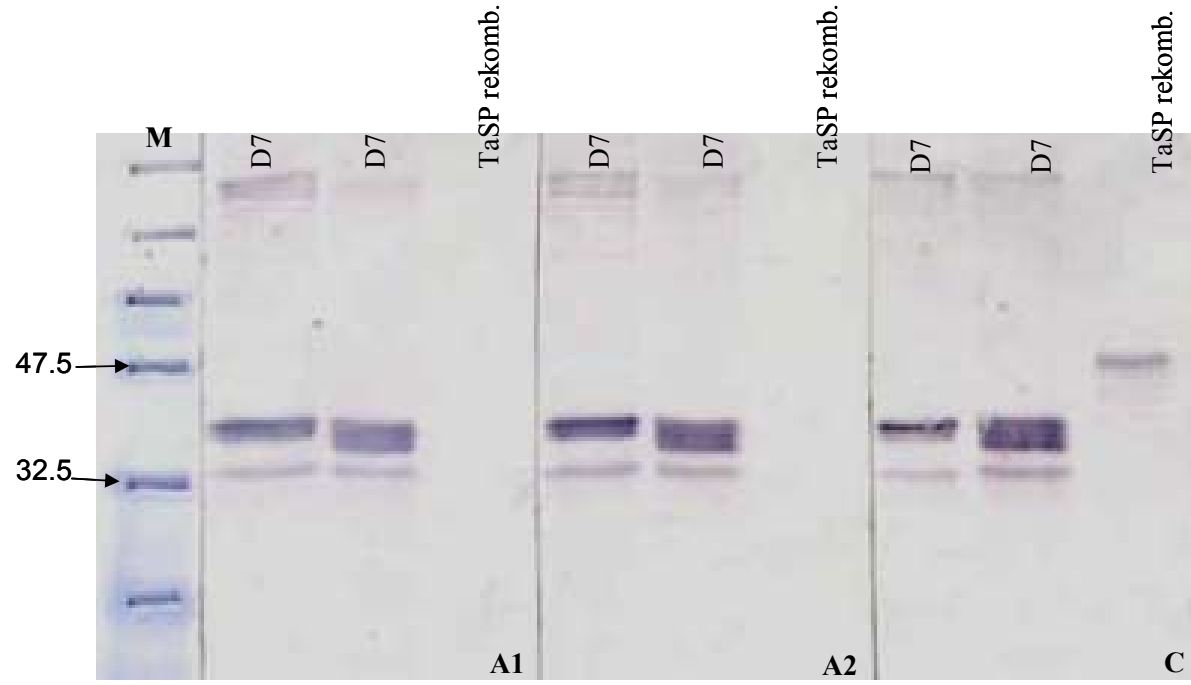
Resim 2.B.2. (Devam)

**Resim 2.B.2.** *Theileria annulata*'nın farklı izolatları, *T. parva* ve *T. lestoquardi* hücre kültürlerinden hazırlanan protein ekstraktları ile TaSP rekombinant proteininin 48C numaralı hayvana ait RES 42. gün bağışık serumu (**B1**, **B2**, **B3**, **B4**, **B5**, **B6** ve **B7**) ve TaSP rekombinant proteinine karşı geliştirilen antiserum (**A1**, **A2**, **A3**, **A4**, **A5**, **A6** ve **A7**) kullanılarak yapılan Western blot sonuçları. M; moleküler protein belirleyici (Bio – Rad, İngiltere).

### 2.B.2.2. Bağışık Serumların TaSP ile Bloklanması

*Theileria annulata*'ya karşı bağışık hayvan serumu içerisindeki TaSP molekulüne karşı oluşmuş özgül antikorumları rekombinant TaSP proteini ile nötralize edildikten sonra yapılan üç blot da elde edilen sonuçlar Resim 2.B.3'de verilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda (250 ve 500µg) rekombinant protein ile bloklanan iki serum rneği sırasıyla birinci ve ikinci membranlarda, bloklanmamış serum rneği ise üçüncü membranda kontrol amacıyla kullanılmıştır. İçerisinde nötralize edilmiş zgl TaSP antikorumlarını içeren iki serum rneği kullanılarak yapılan western blotlamalar sonucunda; membranlarda kullanılan iki D7 hücre ekstraktında (D7 I ve II) belirlenen dominant bantlarda, kontrol olarak bloklanmamış RES 42. gün serumu ile yapılan blotlarda belirlenen bantlar arasında herhangi bir fark görülmemiştir. Bununla birlikte içerisinde zgl TaSP antikorumlarını içeren bloklanmamış serum kullanılan membranda TaSP rekombinant proteinine karşı reaksiyon oluşurken (Resim 2.B.3, C), bloklanmış serum kullanılan birinci ve ikinci membrandaki TaSP rekombinant proteinine karşı herhangi bir reaksiyon oluşmamıştır (Resim 2.B.3, A ve B). Aynı zamanda iki farkı konsantrasyonda (250 ve 500µg) rekombinant protein kullanılarak bloklanan bir ve ikinci membranlarda blotlama sonucunda herhangi bir fark görülmemiştir.



**Resim 2.B.3.** Protein ekstarklarında gözlenen immunodominant bantların TaSP olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılan Western blot sonucu. **A1** ve **A2**; nötralize 48C RES 42. gün serumu, **C**; nötralize edilmemiş 48C RES 42. gün. M; moleküler protein belirleyici (Bio – Rad, İngiltere).

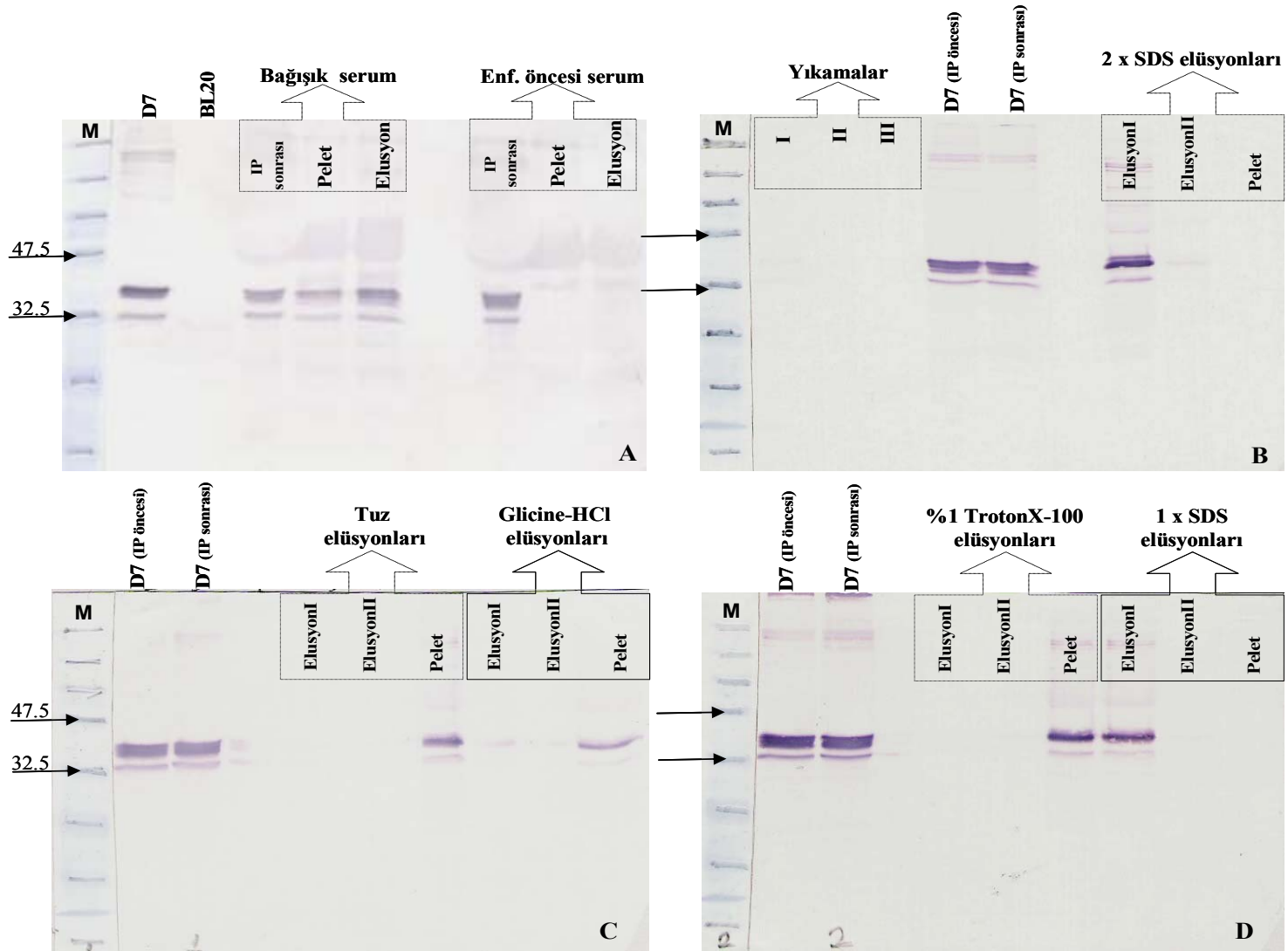


### 2.B.2.3. İmmunopresipitasyon (IP) ve Proteomiks Analiz Sonuçları

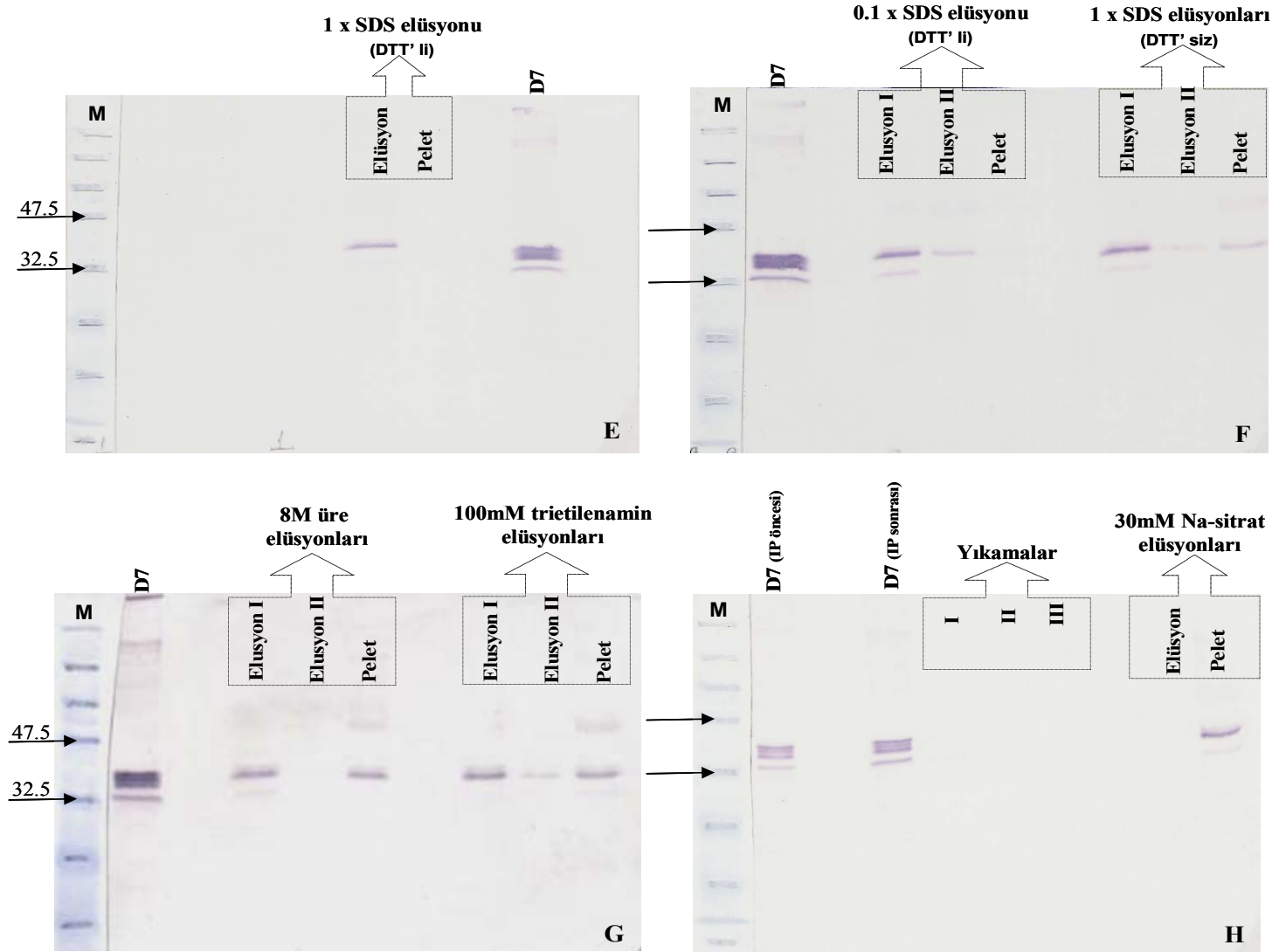
Makroşizont dönemine ait hücre ekstraktlarında blotlamalar sonucu gözlenen immunodominant bantların belirlenmesi amacıyla *T. annulata* Ankara izolatının klonal D7 hücre kültüründen hazırlanan toplam hücre ekstraktlarında bulunan proteinler, üzerlerinde pürifiye edilip, temizlenmiş IgG'ler ile kaplanmış magnetik dynabead'lerce tutulmuş özgül olarak tutulmuş ve bu proteinler 10 farklı solüsyon (DTT'li veya DTT'siz 1xSDS, 2xSDS, 0.1xSDS,  $\geq$ 1M NaCl, pH 8.4, 0.1M glicin HCl, pH 2.8, %1 TritonX-100, 8M üre, 100mM trietilenamin ve 30mM Na-sitrat) kullanılarak elüye edilmiştir. Daha sonra her elüsyonda bulunan proteinler ve bunların miktarlarının belirlenmesi amacıyla 48C RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan western blotlama sonuçları Resim 2.B.4'de verilmiştir.

Bağışık serum (48C RES 42. gün) ve enfeksiyon öncesi (ES) serum (kontrol) ile yapılan IP'ü takiben elüye edilen proteinler kullanılarak yapılan blotlama sonucunda bağışık serum kullanılarak yapılan presipitasyonda 1xSDS (DTT'li) ile elde edilen elüsyonda 32–42 kDa aralığında istenilen bantlar görülürken, enfeksiyon öncesi serum kullanılarak yapılan presipitasyon sonrası elde edilen elüsyonda herhangi bir bant görülmemiştir (Resim 2.B.4, A).

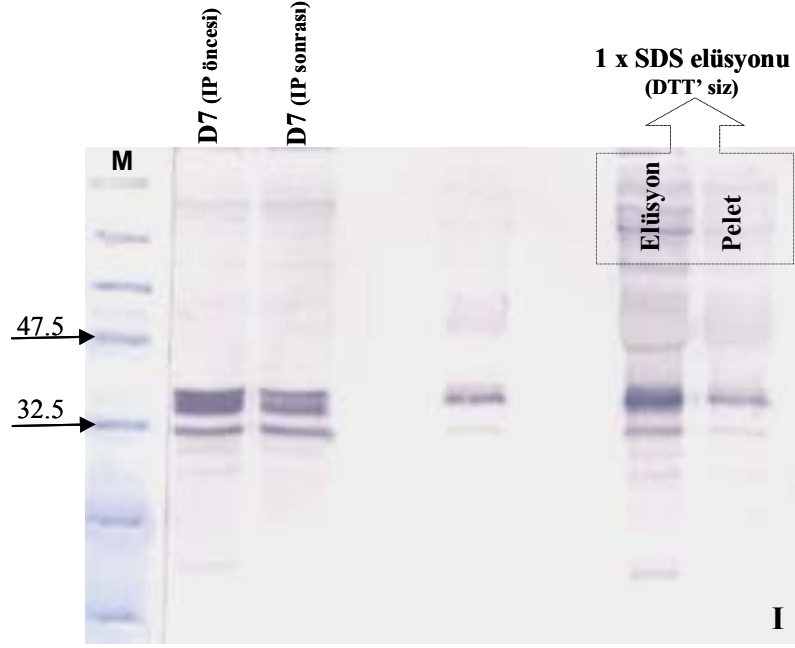
IP'ü takiben DTT'siz 1xSDS kullanılarak yapılan elüsyonlarda istenilen proteinlerin (32–42 kDa) çoğunun elüye edildiği ve IgG'ler ile kontaminasyonun az olduğu görülmektedir, ancak hala proteinlerin bir kısmı bağlı olarak boncuklarda kalmaktadır (Resim 2.B.4, F), bununla birlikte IP öncesi ve IP sonrası ekstraktlara bakıldığında 32–42 kDa aralığındaki diğer bantların tam olarak presipite edilemediği görülmüştür (Resim 2.B.4, I). Kaynatılarak DTT'li 1xSDS içerisinde yapılan elüsyonlara bakıldığında neredeyde tüm proteinlerin elüye edilebildiği görülmekte, ancak proteinler ile birlikte aynı zamanda IgG'lerde elüye olmaktadır (Resim 2.B.4, D). Kaynatılmadan DTT'li 1xSDS içerisinde yapılan elüsyonlarda ise protein miktarı oldukça düşmüş ve hala IgG kontaminasyonuna rastlanılmıştır. Dilüsyon yöntemi ile SDS konsantrasyonunu düşürerek (0.1xSDS) hem kaynatılarak hemde kaynatılmadan yapılan denemelerde IgG kontaminasyonu azalırken, proteinlerin büyük bölümü elüye edilebilmiştir (Resim 2.B.4, F). Presipitasyon sonrası 2xSDS (DTT'li) içerisinde kaynatılarak yapılan birinci elüsyonda elde edilen protein miktarı diğerlerine göre daha fazla olmuş ve ikinci elüsyonda çok az miktarda kalan proteinlerde elüye edilerek blotlamalar da pelette reaksiyon veren her hangi bir protein varlığına rastlanmamıştır, yani; dynabead'lere bağlı kalan protein miktarı oldukça düşmüştür (Resim 2.B.4, B).



**Resim 2.B.4.** Dynabead manyetik boncukları ile yapılan immunopresipitasyonda farklı elüsyonlar sonrası elde edilen proteinlerle RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan Western blot sonuçları (*Devam*),



**Resim 2.B.4.** Dynabead manyetik boncukları ile yapılan immunopresipitasyonda farklı elüsyonlar sonrası elde edilen proteinlerle RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan Western blot sonuçları (*Devam*),



**Resim 2.B.4.** Dynabead manyetik boncukları ile yapılan immunopresipitasyonda farklı elüsyonlar sonrası elde edilen proteinlerle RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan Western blot sonuçları. (A); D7 ve BL20 ekstraktları ile bağışık ve enfeksiyon öncesi (kontrol) serumla yapılan immunopresipitasyon sonrası IP sonrası D7 ekstraktı, pelet ve DTT'li elüsyonlar, (B); IP öncesi ve IP sonrası elde edilen D7 ekstraktları, 2xSDS (DTT'li) kullanılarak elde edilen birinci (elüsyon I), ikinci (elüsyon II) elüsyonlar ile peletler, (C); IP öncesi ve IP sonrası elde edilen D7 ekstraktları, tuz ve glisin-HCL kullanılarak elde edilen birinci (elüsyon I), ikinci (elüsyon II) elüsyonlar ile peletler, (D); IP öncesi ve IP sonrası elde edilen D7 ekstraktları, %1 TritonX-100 ve 1 x SDS (DTT'li) kullanılarak elde edilen birinci (elüsyon I), ikinci (elüsyon II) elüsyonlar ile peletler, (E ve F); D7 hücre ekstraktı, DTT'li 1xSDS (E), 0.1xSDS ile DTT'siz 1xSDS (F) elüsyonları ile peletler, (G ve H); D7 hücre ekstraktı, 8M üre, 100mM trietilenamin (G) ve 30mM Na-sitrat (H) kullanılarak elde edilen birinci (elüsyon I), ikinci (elüsyon II) elüsyonlar ile peletler, (I); IP öncesi ve IP sonrası elde edilen D7 ekstraktları, pelet ve DTT'siz elüsyonlar. M; moleküler protein belirleyici (Bio-Rad, İngiltere).

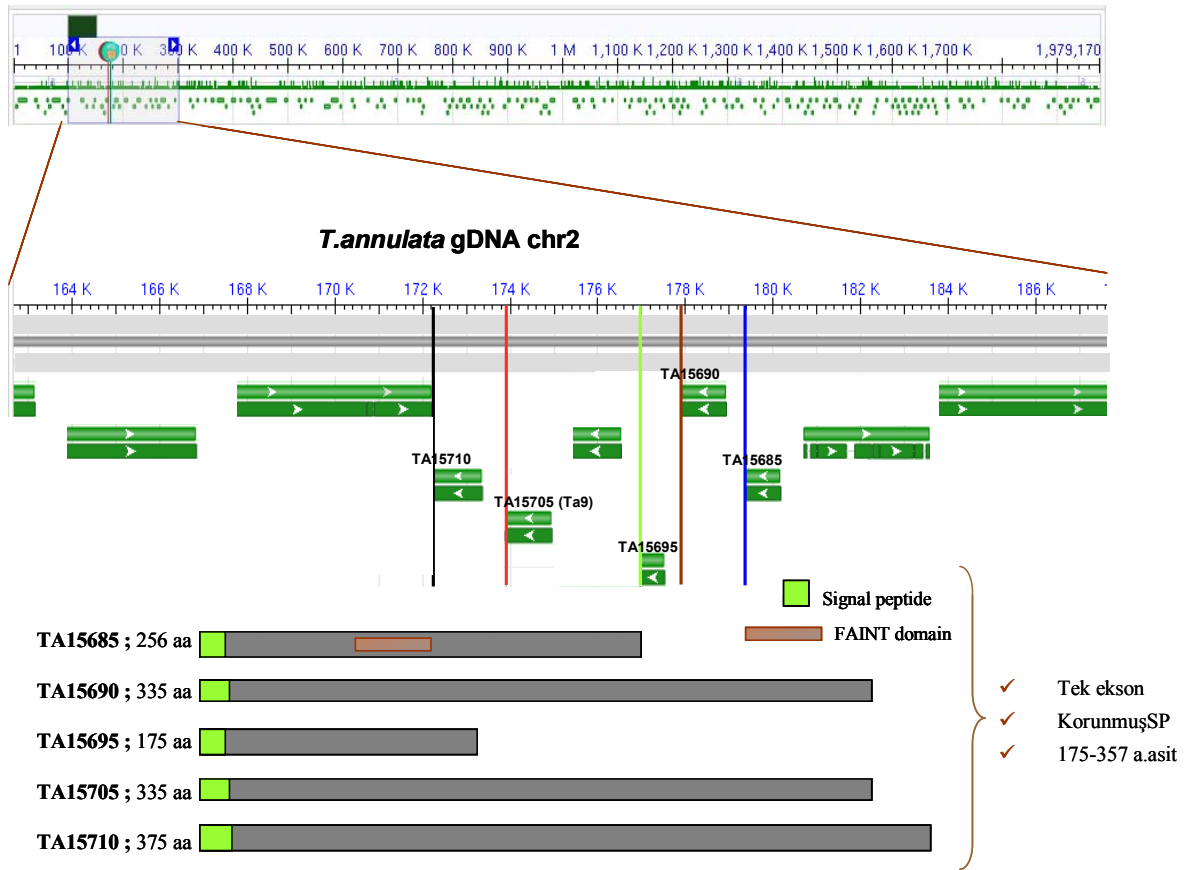
Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ( $\geq 1M$ ) tampon solüsyonu kullanılarak yapılan elüsyonlarda hem birinci hemde ikinci elüsyonlarda herhangi bir proteine rastlanılmamış ve tüm proteinler dynabead'lere bağlı halde kalmıştır (Resim 2.B.4, C). Blotlamalar da 0.1 M glisin-HCl, pH 2.7 kullanılarak yapılan birinci ve ikinci elüsyonlarda ise çok zayıf bir reaksiyon görülmüş, ancak proteyinlerin çoğu elüye edilememiştir (Resim 2.B.4, C). %1 TritonX-100 tampon solüsyonu kullanılarak yapılan elüsyonlarda ise hiç bir proteine rastlanamamıştır (Resim 2.B.4, D). 8M üre ve 100mM trietilenamin kullanılarak yapılan elüsyonlarla elde edilen blotlama sonuçları SDS (DTT'li ve DTT'siz) elüsyonları ile karşılaştırıldığında daha az IgG kontaminasyonu olmasına karşın tüm proteinleri elüye edememektedir (Resim 2.B.4, G). Bir diğer elüsyon tampon solüsyonu olan Na-sitrat, pH 3.0 kullanılarak yapılan elüsyonlarda hiçbir proteine rastlanmamış ve tüm proteinler bağlı olarak kalmıştır (Resim 2.B.4, H).

SDS tampon solüsyonu kullanılarak elüye edilen tüm presipite proteinler bir araya toplandıktan sonra yapılan SDS-PAGE'de kesilen protein bantının mass spektrofotometrik yöntemle yapılan proteomiks analizi sonucunda elde edilen peptid dizilimleri Mascot tarama programı ile incelenmiştir. Mascot tarama sonucunda; sekans analizi için gönderilen protein bantında konak hücre kaynaklı yoğun kontaminasyona rastlanmış, buna rağmen *T. annulata* Ankara C9 genomunda bulunan TA15705 geni tarafından kodlanan hipotetik protein ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) hiti elde edilmiştir (Çizelge 2.B.1).

**Çizelge 2.B.1. IP sonucunda SDS–PAGE’den elde edilen protein bantının mass spektrofotometrik yolla peptid dizilerinin Mascot tarama sonuçları**

<b>Protein hit:</b>	
<a href="#">gi 27807377</a>	glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2) [Bos taurus]
<a href="#">gi 109659291</a>	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 [Bos taurus]
<a href="#">gi 223046</a>	aminotransferase, Asp
<a href="#">gi 156120479</a>	aldolase A [Bos taurus]
<a href="#">gi 222979</a>	aminotransferase, Asp
<a href="#">gi 149640738</a>	Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor (Transaminase A) (Glutamate oxaloacetate transaminase 2) [Ornithorhynchus anatinus]
<a href="#">gi 6730618</a>	Chain A, Rabbit Muscle Aldolase AFRUCTOSE-1,6-Bisphosphate Complex
<a href="#">gi 28614</a>	aldolase A [Homo sapiens]
<a href="#">gi 62751962</a>	serine/threonine kinase receptor associated protein [Bos taurus]
<a href="#">gi 119914679</a>	GBI2 isoform 1 [Bos taurus]
<a href="#">gi 3493529</a>	histone macroH2A1.2 [Homo sapiens]
<a href="#">gi 8393519</a>	H2A histone family, member Y [Rattus norvegicus]
<a href="#">gi 126305177</a>	Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor (Transaminase A) (Glutamate oxaloacetate transaminase 2) [Monodelphis domestica]
<a href="#">gi 3395780</a>	histone macroH2A1.1 [Gallus gallus]
<a href="#">gi 156120947</a>	phosphoserine aminotransferase [Bos taurus]
<a href="#">gi 12653507</a>	Glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2) [Homo sapiens]
<a href="#">gi 229506</a>	aldolase C
<a href="#">gi 77736299</a>	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3 [Bos taurus]
<a href="#">gi 119890312</a>	uroporphyrinogen decarboxylase isoform 1 [Bos taurus]
<a href="#">gi 115497946</a>	LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 [Bos taurus]
<a href="#">gi 78369456</a>	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) [Bos taurus]
<a href="#">gi 31559916</a>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform a [Mus musculus]
<a href="#">gi 136429</a>	Trypsin precursor
<a href="#">gi 229503</a>	aldolase
<a href="#">gi 5453854</a>	poly(rC) binding protein 1 [Homo sapiens]
<a href="#">gi 149584726</a>	histone macroH2A1.1, partial [Ornithorhynchus anatinus]
<a href="#">gi 78042550</a>	glutaredoxin 3 [Bos taurus]
<a href="#">gi 158749613</a>	uroporphyrinogen decarboxylase [Rattus norvegicus]
<a href="#">gi 1498643</a>	uroporphyrinogen decarboxylase
<a href="#">gi 3599503</a>	guanine nucleotide-binding protein Gi alpha subunit [Xenopus laevis]
<a href="#">gi 6677598</a>	guanine nucleotide-binding protein Gi2 alpha-subunit [Squalus acanthias]
<a href="#">gi 120998</a>	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha (G(i) alpha-3)
<a href="#">gi 21703762</a>	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M [Mus musculus]
<a href="#">gi 155371923</a>	nudix -type motif 9 [Bos taurus]
<a href="#">gi 73986866</a>	similar to Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase) (Lung cancer antigen NY-LU-1) isoform 1 [Canis familiaris]
<a href="#">gi 306875</a>	C protein
<a href="#">gi 149693706</a>	uroporphyrinogen decarboxylase isoform 1 [Equus caballus]
<a href="#">gi 109510541</a>	Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Numatrin) (Nucleolar protein NO38) [Rattus norvegicus]
<a href="#">gi 12856069</a>	unnamed protein product [Mus musculus]
<a href="#">gi 77735757</a>	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain [Bos taurus]
<a href="#">gi 115497482</a>	zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 1 [Bos taurus]
<a href="#">gi 109111852</a>	phosphoserine aminotransferase isoform 1 isoform 2 [Macaca mulatta]
<a href="#">gi 122141</a>	BOLA class I histocompatibility antigen, alpha chain BL3-7 precursor
<a href="#">gi 7023053</a>	unnamed protein product [Homo sapiens]
<a href="#">gi 71897339</a>	protein phosphatase 2A, regulatory subunit B' [Gallus gallus]
<a href="#">gi 312137</a>	fructose bisphosphate aldolase [Homo sapiens]
<a href="#">gi 84994198</a>	<b>hypothetical protein TA15705 [Theileria annulata Ankara]</b>
<a href="#">gi 147771375</a>	hypothetical protein [Vitis vinifera]
<a href="#">gi 73977140</a>	Uroporphyrinogen decarboxylase (URO-D) (UPD) isoform 2 [Canis familiaris]

Proteini kodlayan TA15705 geni 1008 bp uzunluğunda tek bir ekzona sahip, parazitin makroşizont döneminde sentezlenip ve ikinci kromozom üzerinde (Şekil 2.B.6) yer almaktadır. Gen bölgesi tarafından kodlanan proteinin 35 kDa ağırlığında, N-terminal ucunda 18 ve 19. amino asitler arasında muhtemel kesim bölgesi olan bir signal peptid içerdiği belirlenmiştir. *T. annulata* genomunda muhtemel gen duplikasyonuna bağlı TA15705 geninin de içerisinde bulunduğu ve toplamda beş genden oluşan paralog gen ailesi bulunmaktadır. Paralog aile içerisinde yer alan genlerin kromozomal yerleşimi ve kodladıkları proteinlere ait özellikler Şekil 2.B.6'da verilmiştir. Bu genlerin tümü tek bir ekzona sahip olup, ikinci kromozom üzerinde yer almaktadırlar. Ayrıca gen bölgeleri tarafından kodlanan proteinler arasında korunmuş bir signal peptid bulunmakta ve ilgili genler 175–357 amino asit uzunluğunda proteinleri kodlamaktadırlar.



Şekil 2.B.6. Ta9 ve paralog genlerinin *T. annulata* gDNA'sı ikinci kromozomu üzerindeki yerleşim yerleri ve kodlanan proteinlerin ortak özellikleri.

TA15705 (Ta9) paralog ailesinde bulunan genlerin biyoinformatik inceleme sonuçları Çizelge 2.B.2’de verilmiştir. Paralog aile genlerinin hepsinin makroşizont döneminde sentezlendiği ve TA15690, TA15695, TA15705 (Ta9) ve TA15710 genlerinin makroşizont dönemine ait EST verileri sırasıyla 10, 17, 10 ve 4 olarak belirlenmiştir. Ailede bulunan tüm paralog gen proteinlerinin clustal X programı ile yapılan karşılaştırmaları sonucunda 1–20. amino asitler arasında korunmuş signal peptid içeren alan olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.B.7). Bunun yanında, Ta9 paralog ailesinde bulunan genlerin membran topolojilerinin belirlenmesi amacıyla Toppred bilgisayar programı (G. von Heijn 1992) kullanılarak yapılan analizlerde ailede bulunan genlerin hepsinin salgısal proteinleri kodladığı belirlenmiş ve hiçbir proteinde transmembran alanlara rastlanmamıştır. Tüm genler yüksek dN/dS verilerine (0.31–0.38) sahip olmalarına karşın PEST motifi içermemektedir. Pfam analizlerinde TA15685 haricindeki proteinlerde FAINT domaine rastlanmamış, ancak TA15685 proteinin de bir adet FAINT domain olduğu görülmüştür. Ailede bulunan genler uzunlukları 175–357 amino asit arasında değişen 19–37.9 kDa moleküler ağırlığa sahip proteinleri kodlamaktadır (Çizelge 2.B.2).



```

TA15695 MNLVTSGIILYSFYICVCMDDPGADGGNNPPGD-----NPP-PSRP-----AKCT
TA15690 MNLVTSGIILYSFYICVCMDDPGAEEPEKSDSGI-----RFYGDGEP-----VKSD
TA15705 MNLLTSGIILYSFYIYSTCMTDSSDSDDEDGDGDGDSMLPPHQSRSPMFEGTLGESFTGGYSKEELESKFPMRMGKGPDKGPAKPKPTPGP-----VKDT
TA15710 MNLVTSGIILYSFYICVCMDDPGSEPEKSDSGIRLYG-----DGDVFTTTLKLTPEEANILKDLLVSYQECVSKSGSKPSDDPKPDLGIIRRDGDGNPLFLQTHEVTQEEAEILSW
TA15685 MNLVTSGIILYSLYICVCMDDPEDGSEHESAVVD-----GDDATEPPP-----YET
***:*****:*. . .** . . . . .
*

TA15695 LLPTDDEAQQALGPPVCTPGDCGP-----
TA15690 MMPTEEEAKGALGPPVCTPGDCGPP---TPGHGTPGYPSEAAEGYGTSDYSPYVPRPYGQSSPGSYGAPGYGYVPGGYGTPRHSTTQGYRTPVYCPFCFPYGTGATGYGGYIPQGPY
TA15705 MMPGDQEARGASGGPGTYP--YPPQ----GYPTGGYPPQATGGYGQPGPYQTGPYPYPQGQPGPYVQTPGGYGQPGKG-----PAYPPDPYGASGGYGPPGHGPAYPPDPY
TA15710 LLKNHDPKQDPSAPPEERPPYPSPGPYLTPGPSAPPYPIETPGGYGG---YMSQGPYQPSGAGYGAPGYGPFYFPGYG-----QQTPTGTYPPYPQGPYGAEGATGGYGGG--
TA15685 VVQNPNNPPYHHGYHFVHTHTSGTD-----DDDPPPPYTPEPQNYLPLPLNQSQASYT-----YPYSPRSVDSRSPTGSDATPDYYG----
:: : . . . . .

TA15695 -----HP-----HAADGTLTLPVDAKNVSNNRHTFFCKYT-GPDKKSHHELKPGHGCGFNSVSYGGEQVWEMEREN
TA15690 GARHSYSPGGYSPRYPTQPSPYRATSGNGAGASGDAGSPGQQTQPS---GPPTRAPDGTKLFSIDAKTGSNCSNVIVKEYISGRHNRHFHRRLLNPKPGFGFNSVSYNGVSVWEMRVDK
TA15705 GASG-----ATGGYGGGASGGAEGPGQPTGPPGSSGPPTQAPDGTKLGPVDAKTAKNGEHVNVDEFRAGSHDHRHRRITPKHGHGFNRVNYDGLRVWIMDGFK
TA15710 -----ATGGAGGYGTSWGQVPSAPEADPSGSPGVSTPGAGGLRLVHLDKVENECGLYEVLEYNLPGKGGKHRRYKPNCGFGIRMVTYAGVVWKMMDGQH
TA15685 -----SSLYGQATGYTPSLSTTSQAAS-----DQLPPDELQLVDLDTKSKCSSNSTLSTHLIKVKG-MIHKYSPKEGFGYKKITHGNVVVWSMENGI
. . . . . * :*: . . . . . :. . * * * . :. . ** *

TA15695 YGTGVDVHPIGDSHKTLVVTMKDGSKKIYQKRKGKGPWE---EKN-----
TA15690 YATEVFLYPLRSPQKTLIMLIDGIIKTFKRKGKKNKPWK---EKDVNIRGELFIRQALS
TA15705 YATGVLLFPLGFGEKTLVITYSDGSKKTFKKRGNAPWE---EKD-----
TA15710 HATEVTLIGVGTGNKKIDVKLSNGTRVRFKRGGKDKQWKRDIKQ-----
TA15685 YATKASVIGVGFSGKQITIELINGITINLKKRGHKKEWVQVTPR-----
:. * . : : * : : :* : : * * * :

```

**Şekil 2.B.7.** Ta9 paralog gen ailesince kodlanan proteinlerin amino asit düzeyinde clustal X (2.0) programı kullanılarak birbirleri ile karşılaştırılması. Karşılaştırılan amino asit dizilimlerindeki tamamı ile korunmuş bazlar '\*' ile, güçlü gruplar arasında tamamı ile korunmuş amino asitleri içeren alanlar ':' ile, zayıf gruplar arasında tamamı ile korunmuş amino asitleri içeren alanlar '.' ile ve karşılaştırılan amino asitler arasındaki boşluklarda '-' ile belirtilmiştir. **Gölgelenmiş bölgeler;** 1–20 amino asitler arasındaki korunmuş signal peptid alanını belirtmektedir.

**Çizelge 2.B.2.** Ta9 paralog gen ailesinde kodlanan proteinlerin biyoinformatik inceleme sonuçları

<i>T.a</i> ismi	Ürün	Macro.	Mero.	Piro.	SP	TMD	GPI	NLS	DN/DS	PEST	FAINT	Macr. EST	Mero EST	Piro. EST	Ma (kDa)
TA15685 (Ta9.1)	Hipotetikal protein	1	0	0	√	0	-	0	0,3804	-	1	0	0	0	28.0
TA15690 (Ta9.2)	" "	1	0	0	√	0	-	0	-	-	-	10	0	0	35.9
TA15695 (Ta9.3)	" "	1	0	0	√	0	-	0	0,0366	-	-	17	0	0	19
TA15705 (Ta9)	" "	1	0	0	√	0	-	0	0,3166	-	-	10	0	0	34.9
TA15710 (Ta9.4)	" "	1	0	0	√	0	-	0	0,3476	-	-	4	0	0	37.9

(A); Ta9.1 proteinin sekans analiz sonuçları

TA15685 MDPEDGSEHEHAVVDGDDATEPPPYETVVQNPNNPPPYHHGYHFVHTHTSGTDDDDPPPPYTPEPQNYPLPPLNQQSQASYTYPYSPRSVDSRSPTGSDATPDYYGSSLYG  
Ta9.1 MDPEDGSEHEHAVVDGDDATEPPPYETVVQNPNNPPPYHHGYHFVHTHTSGTDDDDPPPPYTPEPQNYPLPPLNQQSQASYTYPYSPRSVDSRSPTGSDATPDYYGSSLYG  
\*\*\*\*\*  
TA15685 QGATGYTPSLSTTSQAASDQLPPDELQLVDLDTKSKCSSNSTLFSSTHLIKVKGMIIHKYSPKEGFGYKKITHGNVVVWSMENGIYATKASVIGVGFSGSKQITIELINGITIN  
Ta9.1 QGATGYTPSLSTTSQAASDQLPPDELQLVDLDTKSKCSSNSTLFSSTHLIKVKGMIIHKYSPKEGFGYKKITHGNVVVWSMENGIYATKASVIGVGFSGSKQITIELINGITIN  
\*\*\*\*\*  
TA15685 LKKRGHKKEWVQVTPR  
Ta9.1 LKKRGHKKEWVQVTPR  
\*\*\*\*\*

(B); Ta9.2 proteinin sekans analiz sonuçları

TA15690 MDPDGAEEPEKSDSGIRFYGDGEPVKSDMMPTEEEEAKGALGPPVCTPGDCGPPTPGHGTPGYPSEAAEGYGTSDYSPYVPRPYGQSSPGSYGAPGYGYVPGGYGTPRHSTTQ  
Ta9.2 MDPDGAEEPEKSDSGIRFYGDGEPVKSDMMPTEEEEAKGALGPPVCTPGDCGPPTPGHGTPGYPSEAAEGYGTSDYSPYVPRPYGQSSPGSYGAPGYGYVPGGYGTPRHSTTQ  
\*\*\*\*\*  
TA15690 YRTPVYCPCFPGPYGTGATGYGGYIPQGPYGARHSYSPGGYGSRYPTQPSYRATSGNGAGASGDAGSPGQQTQPSGPPTRAPDGTKLFSIDAKTGSNCSNVIVKTQP  
Ta9.2 YRTPVYCPCFPGPYGTGATGYGGYIPQGPYGARHSYSPGGYGSRYPTQPSYRATSGNGAGASGDAGSPGQQTQPSGPPTRAPDGTKLFSIDAKTGSNCSNVIVKTQP  
\*\*\*\*\*  
TA15690 SPYRATSGNGAGASGDAGSPGQQTQPSGPPTRAPDGTKLFSIDAKTGSNCSNVIVKEYISGRHNRFHRRLNPKPGFGFNSVSYNGVSVWEMRVDKYATEVFLYPLRSPQK  
Ta9.2 SPYRATSGNGAGASGDAGSPGQQTQPSGPPTRAPDGTKLFSIDAKTGSNCSNVIVKEYISGRHNRFHRRLNPKPGFGFNSVSYNGVSVWEMRVDKYATEVFLYPLRSPQK  
\*\*\*\*\*  
TA15690 TILIMLIDGIIKTFKRKGKKNPWKEKDVNIRGELFIRQALS  
Ta9.2 TILIMLIDGIIKTFKRKGKKNPWKEKDVNIRGELFIRQALS  
\*\*\*\*\*

(C); Ta9.3 proteinin sekans analiz sonuçları

TA15695 MDPDGDAGGNNPPGDNPPSRPAKCTLLPTDDEAQGALGPPVCTPGDCGPHPHAADGTLTLPVDAKNVSNRHTFFCKYTGPDKKSHHELKPGHGCGFNSVSYGGEQVWE  
Ta9.3 MDPDGDAGGNNPPGDNPPSRPAKCTLLPTDDEAQGALGPPVCTPGDCGPHPHAADGTLTLPVDAKNVSNRHTFFCKYTGPDKKSHHELKPGHGCGFNSVSYGGEQVWE  
\*\*\*\*\*  
TA15695 MERENYGTGVDVHPIGDShKTLVVTMKDGSKKIYQKRKGKGPWEEKN  
Ta9.3 MERENYGTGVDVHPIGDShKTLVVTMKDGSKKIYQKRKGKGPWEEKN  
\*\*\*\*\*

Şekil 2.B.8. Klonlanarak, pürifiye edilen Ta9 ve paralog genleri tarafından kodlanan proteinlerin dizilim analiz sonuçları (Devam),

**(D); Ta9 proteinin sekans analiz sonuçları**

```
TA15705 MDSSDSDEDGDGDGDSMLPQHRSMPFEGTLGESFTGGYSKEELESKFPKMRMGKGPDKGPAKPKPTPGPVKDTMMPGDQEARGASGGPGTYPYPPQGYPTGGYPPQATG
Ta9 MDSSDSDEDGDGDGDSMLPQHRSMPFEGTLGESFTGGYSKEELESKFPKMRMGKGPDKGPAKPKPTPGPVKDTMMPGDQEARGASGGPGTYPYPPQGYPTGGYPPQATG
*****

TA15705 GYQPGPYQTGPYPYPQGPYPVQTPGGYGQPGKGPAYPPDPYGASGGYGGPHGPAAYPPDPYGASGATGGYGGGASGGAEGPQPTGPPGPSSGPPTQAPDGTKLGPV
Ta9 GYQPGPYQTGPYPYPQGPYPVQTPGGYGQPGKGPAYPPDPYGASGGYGGPHGPAAYPPDPYGASGATGGYGGGASGGAEGPQPTGPPGPSSGPPTQAPDGTKLGPV
*****

TA15705 DAKTAKNGEHVNVDEFRAGSHDHRHRRITPKHGHGFNRVNYDGLRVWIMDGFKYATGVLLFPLGFGEKTLVITYSDGSKKTFKKRGNAPWEEKD
Ta9 DAKTAKNGEHVNVDEFRAGSHDHRHRRITPKHGHGFNRVNYDGLRVWIMDGFKYATGVLLFPLGFGEKTLVITYSDGSKKTFKKRGNAPWEEKD
*****
```

**(E); Ta9.4 proteinin sekans analiz sonuçları**

```
Ta9.4 MDPDGSEPEKSDSGIRLYGDGDPVFTTTTLKLTPEEANILKDLLVSYQECVSKSGSKPSDDPKDLGI IRRDGDGNPLFLQTHEVTQEEAEILSWLLKNHDPKQDPSAPPEE
TA15710 MDPDGSEPEKSDSGIRLYGDGDPVFTTTTLKLTPEEANILKDLLVSYQECVSKSGSKPSDDPKDLGI IRRDGDGNPLFLQTHEVTQEEAEILSWLLKNHDPKQDPSAPPEE
*****

Ta9.4 RPPPYSPGPYLTPGPSAPPYPIETPGGYGGYMSQGPYQPSGAGYGAPGYGPYFPGGYGQQTPGTYPYPYPQQGPYGAEGATGGYGGGATGGAGGYGTSWGQVPSAPEADP
TA15710 RPPPYSPGPYLTPGPSAPPYPIETPGGYGGYMSQGPYQPSGAGYGAPGYGPYFPGGYGQQTPGTYPYPYPQQGPYGAEGATGGYGGGATGGAGGYGTSWGQVPSAPEADP
*****

Ta9.4 SGPSGVSTPGAGGLRLVHLDAKVENECGLYEVLEYNLPGKGGKHRRYKPNCGFGIRMVTYAGVVWVWMDGQHHATEVTLIGVGTGNKKIDVKLSNGTRVRFKRGGKDKQW
TA15710 SGPSGVSTPGAGGLRLVHLDAKVENECGLYEVLEYNLPGKGGKHRRYKPNCGFGIRMVTYAGVVWVWMDGQHHATEVTLIGVGTGNKKIDVKLSNGTRVRFKRGGKDKQW
*****

Ta9.4 KRDIKQ
TA15710 KRDIKQ
*****
```

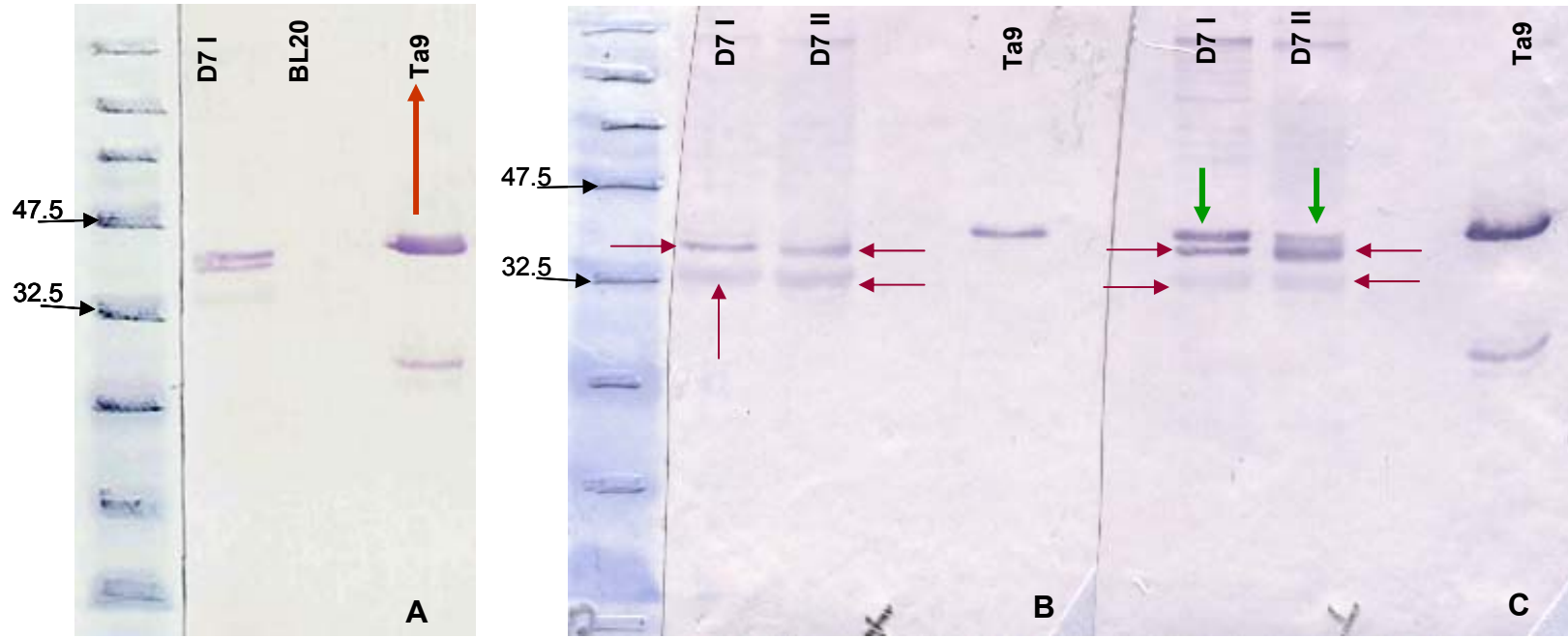
**Şekil 2.B.8.** Klonlanarak, pürifiye edilen Ta9 ve paralog genleri tarafından kodlanan proteinlerin dizilim analiz sonuçları. Ta9.1 (A), Ta9.2 (B), Ta9.3 (C), Ta9 (D), Ta9.4 (E) proteinlerinin amino asit düzeyinde Genedb veri tabanında kayıtlı sırasıyla TA15685, TA15690, TA15695, TA15705, TA15710 genlerine ait protein dizilimlerinin amino asit düzeyinde clustalX (2.0) programı kullanılarak karşılaştırma sonuçları. Karşılaştırılan amino asit dizilimlerindeki tamamı ile korunmuş bazlar '\*' ile belirtilmiştir.

#### 2.3.2.4. Klonlanan Proteinlerin Dizilim ve Western Blot Sonuçları

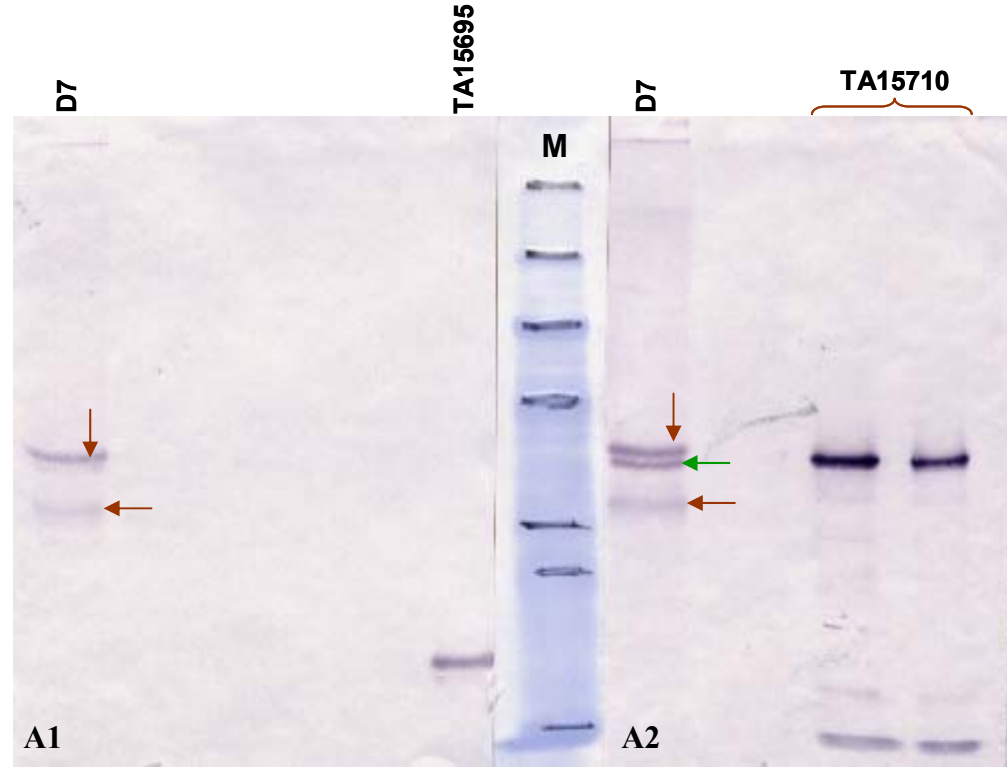
pDEST17 / DH5 $\alpha$  stokları içerisinde bulunan klonlanan ilgili genlere ait protein kodlayan bölgelerin dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan dizilim analiz sonuçları Şekil 2.B.8’de verilmiştir. Analiz sonucunda TA15685 haricinde klonlanarak pürifiye edilen diğer tüm paralog proteinler (Ta9.1, Ta9.2, Ta9.3, Ta9, Ta9.4) Genedb veri tabanında ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) kayıtlı *T. annulata* genomunda yer alan ilgili gen bölgelerine ait protein dizilimleri ile amino asit düzeyinde %100 benzerlik göstermiştir. TA15685 (Ta9.1) geninin dizilim analizlerinde bir amino asitte değişme (fenilalanin / serin) belirlenmiş ve buna bağlı benzerlik oranı %99’a gerilemiştir (Şekil 2.B.8, A).

Mass spektrofotometrik analizler sonucunda elde edilen TA15705 hiti tarafından kodlanan proteinin (Ta9) D7 ekstraktlarında western blotlamalarda görülen dominant bantlardan hangisi olduğunun belirlenmesi amacıyla yapılan bloklama deneyi (Bknz.; 2.3.1/Bağışık Serumların TaSP ile Bloklanması ve Western Blotlama) sonrası elde edilen sonuçlar ve proteinin 48C RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan Western blot sonucu Resim 2.B.5’de verilmiştir. Bloklanmamış 48C RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan blotlamada D7 ekstraktlarında 32–46 kDa aralığındaki üç dominant bant görülürken, Ta9 rekombinant protein kullanılarak bloklanmış serum kullanılarak yapılan blotlamada D7 hücre ekstraktlarında görülen  $\approx$ 46 kDa ağırlığındaki banta özgü antikorlar nötralize edilmiş ve bu bant bloklanmış membranlarda çok silik reaksiyon göstermiştir (Resim 2.B.5, B). Bloklanmış membranda aynı zamanda Ta9 rekombinant proteinine karşıda bloklanmamış membrana nazaran daha zayıf bant görülmesi serumda bulunan Ta9’a özgü antikorların yeterli miktarda rekombinant protein ile bloklanamamasına bağlı tamamının nötralize edilemediğini göstermektedir.

Paralog ailede bulunan TA15710 geni tarafından kodlanan Ta9.4 rekombinant proteinin Ta9 ile birlikte Western blot da en yüksek antikor yanıtın olduğu ikinci protein olduğu belirlenmiş ve yapılan bloklama deneyi sonucunda bloklanmamış serum kullanılarak yapılan western blotlama sonucunda D7 hücre ekstraktlarında üç bantta görülürken, bloklanmış serum kullanılan membranda D7 ekstraktlarında görülen  $\approx$ 44 kDa ağırlığındaki ikinci dominant bant görülmemiştir (Resim 2.B.6, A1). Ta9 ve Ta9.4 rekombinant proteinleri kullanılarak yapılan bloklama deneyleri sonucunda D7 hücre ekstraktlarında görülen  $\approx$ 44 ve 46 kDa moleküler ağırlığa sahip iki bantı sırasıyla TA15710 ve TA15705 genleri tarafından kodlanan Ta9.4 ve Ta9 proteinleri olduğu belirlenmiştir.



**Resim 2.B.5.** TA15705 (Ta9) rekombinant proteini ile yapılan bloklama deneyinin Western blot sonucu. **(A)**; Ta9 rekombinat proteini ile 48C RES 42. gün serumu, **(B ve C)**; Bağışık serumlar ile yapılan Western blotlarda görülen immunodominant bantların belirlenmesi amacıyla Ta9 rekombinant proteini ile bloklanmış 48C RES 42. gün serumu **(B)** ve bloklanmamış 48C RES 42. gün serumu **(C)** kullanılarak yapılan western blot sonuçları. Bordo ok bloklanmış **(B)** ve bloklanmamış **(C)** membranlardaki D7 ekstraktlarında görülen 32–44 kDa ağırlığındaki iki dominantı göstermektedir. Yeşil renkli ok bloklanmamış **(C)** D7 ekstraktlarında görülen ancak bloklanmamış membranda gözlenmeyen **(C)**  $\approx$ 46 kDa ağırlığındaki bantı göstermektedir. M; moleküler protein belirleyici (Bio–Rad, İngiltere).



**Resim 2.B.6.** TA15710 rekombinant proteini ile yapılan bloklama deneyinin Western blot sonucu. (**A1** ve **A2**); TA15710 rekombinat rekombinant proteini ile bloklanmış 48C RES 42. gün serumu (**A1**) ve bloklanmamış 48C RES 42. gün serumu (**A2**) kullanılarak yapılan western blot sonuçları. Bordo ok bloklanmış (**A1**) ve bloklanmamış (**A2**) membranlardaki D7 ekstraktlarında görülen 32–44 kDa ağırlığındaki iki dominantı göstermektedir. Yeşil renkli ok bloklanmamış (**A2**) D7 ekstraktlarında görülen ancak bloklanmamış mebranda gözlenmeyen (**A1**)  $\approx$ 44 kDa ağırlığındaki bantı göstermektedir. M; moleküler protein belirleyici (Bio–Rad, İngiltere).

Dominant bantlara ait proteinler olduğu belirlenen Ta9 ve Ta9.4 rekombinant proteinlerin farklı B hücre epitoplari içeren ancak aynı gen bölgesi tarafından kodlanan bir proteinde ekspresyon sonrası konak hücrede meydana gelen transformasyona bağıli olarak meydana gelip gelmediğinin belirlenmesi ve buna ilaveten iki protein arasında her hangi bir çapraz reaksiyon olup olmadığının anlaşılması amacıyla ilgili rekombinant proteinler ile ayrı ayrı bloklanmış serum örnekleri kullanılarak yapılan deneyde elde edilen blotlama sonuçları Resim 2.B.7’de verilmiştir. Ta9 rekombinant proteini ile bloklanmış 48C RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan western blotlamada D7 hücre ekstraktlarındaki dominant, ≈46 kDa’luk bant bloke olurken Ta9.4 rekombinant proteinine karşı yüksek reaksiyon görülmüştür (Resim 2.B.7, B). Bunun yanında Ta9.4 rekombinant proteini ile bloklanmış 48C RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan blotlamada Ta9 rekombinant proteinine karşı hala reaksiyon görülürken, D7 ekstraktlarındaki dominant, ≈44 kDa’luk bant bloke olmuştur (Resim 2.B.7, C).

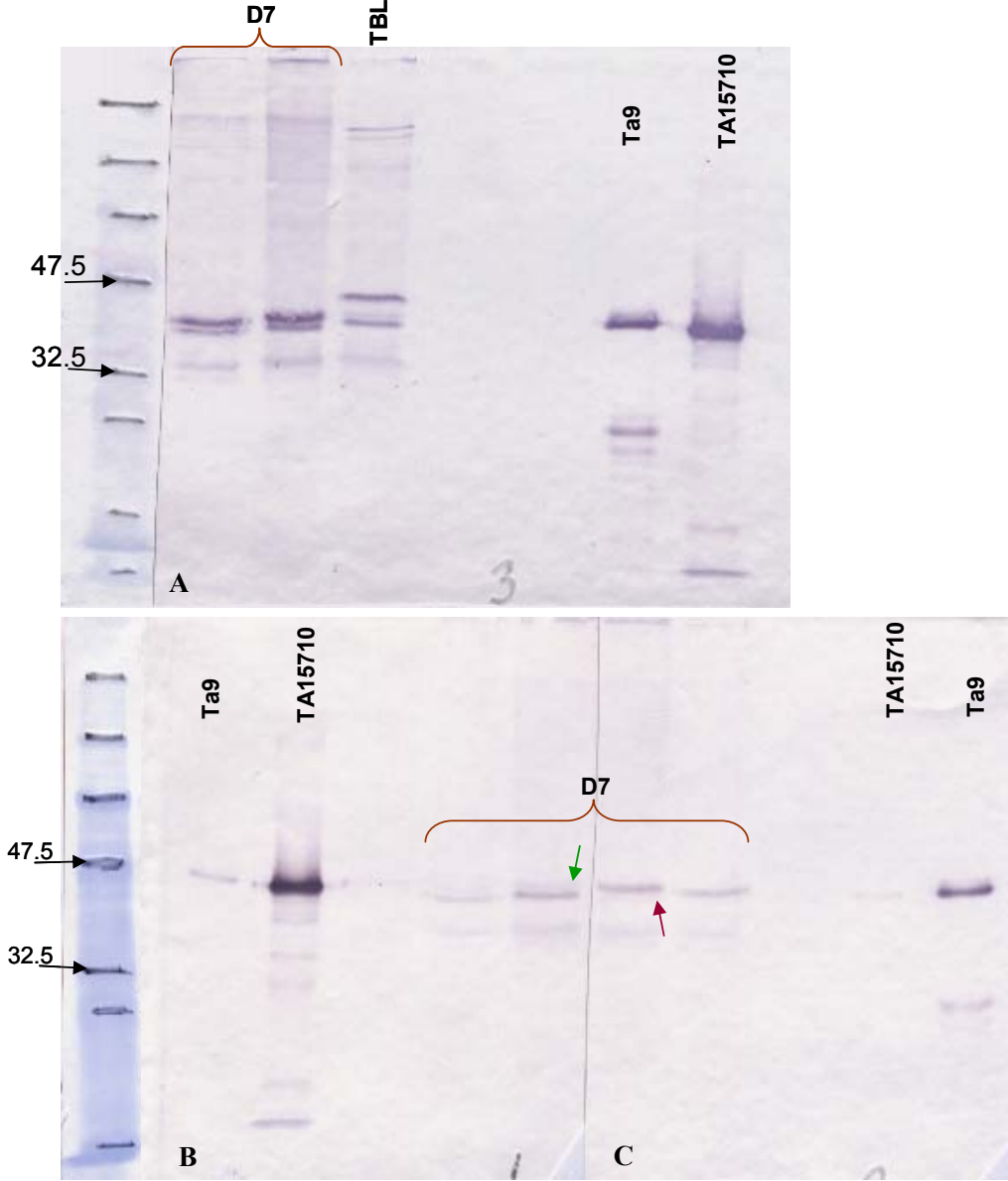
*Theileria annulata* ile enfekte BL20 hücre (TBL) kültürlerinden hazırlanan ekstraktlarda *T. annulata* Ankara izolatının tek klonu olan D7 hücre ekstraktlarında 48C RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan blotlamalarda görülen ≈32-46 kDa aralığında moleküler ağırlığa sahip üç dominant banttan ≈32 ve 46 kDa ağırlığındaki iki bant zayıf reaksiyon verirken, ≈44 kDa’luk banta karşı iyi reaksiyon görülmüştür. Bu üç banta ek olarak birde ≈47 kDa’luk bir dominant bant daha görülmüştür (Resim 2.B.8, A). TBL hücre ekstraktlarında görülen ≈44 kDa’luk dominant bantın Ta9.4 rekombinant proteini olduğu yapılan bloklayma deneyleri ile belirlenmiştir (Resim 2.B.8, C), ancak diğeri bant (≈47 kDa) tanımlanamamıştır.

Ta9.1, Ta9.2 ve Ta9.3 rekombinant proteinlerine karşı oluşan antikor değerlendirilmesi amacıyla sporozoit ile enfekte 48C RES 28 ve 42. günlerde elde edilen serum kullanılarak yapılan western blotlama sonuçları Resim 2.B.8’de verilmiştir. 28 ve 42. gün serumu kullanılarak yapılan blotlamalarda Ta9.1’e karşı oluşan antikor yanıtın Ta9.2’ye oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Resim 2.B.8, A ve B). Bununla birlikte, RES 42. gün serumu ile yapılan blotlamalarda Ta9.3 rekombinant proteini Ta9.1 ve 2’ye oranla en yüksek antikor yanıtın olduğu protein olmuştur (Resim 2.B.8, C2). Blotlamalarda yüksek antikor yanıtı oluşturan Ta9.3 rekombinant proteini kullanılarak yapılan blotlama deneyinde D7 hücre ekstraktlarında görülen dominant bantlarda blotlanmamış membrana oranla daha zayıf bir reaksiyon olduğu gözlemlenmiş olmasına rağmen kodlanan proteinin moleküler ağırlığının 19 kDa oluşu ve bloklanmış membranda rekombinant proteine karşı hiçbir reaksiyon oluşmazken hücre ekstraktlarının olduğu bölgede dominant bantlara bloklanmamış membrana oranla daha az olsada bir reaksiyonun görülmüş olması bu proteinin D7

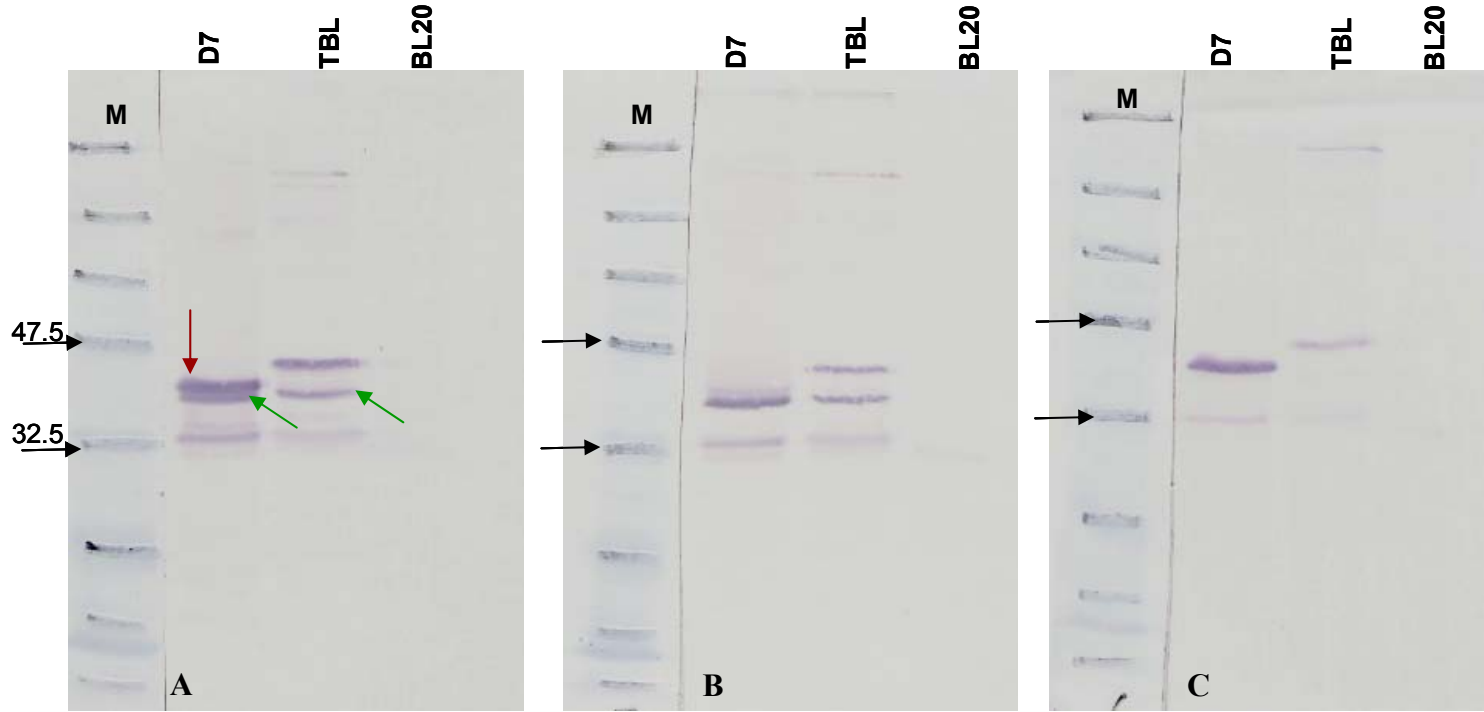


ekstraktlarında görülen 32–46 kDa aralığındaki dominant bantlarda biri olmadığını göstermektedir (Resim 2.B.9, C1).

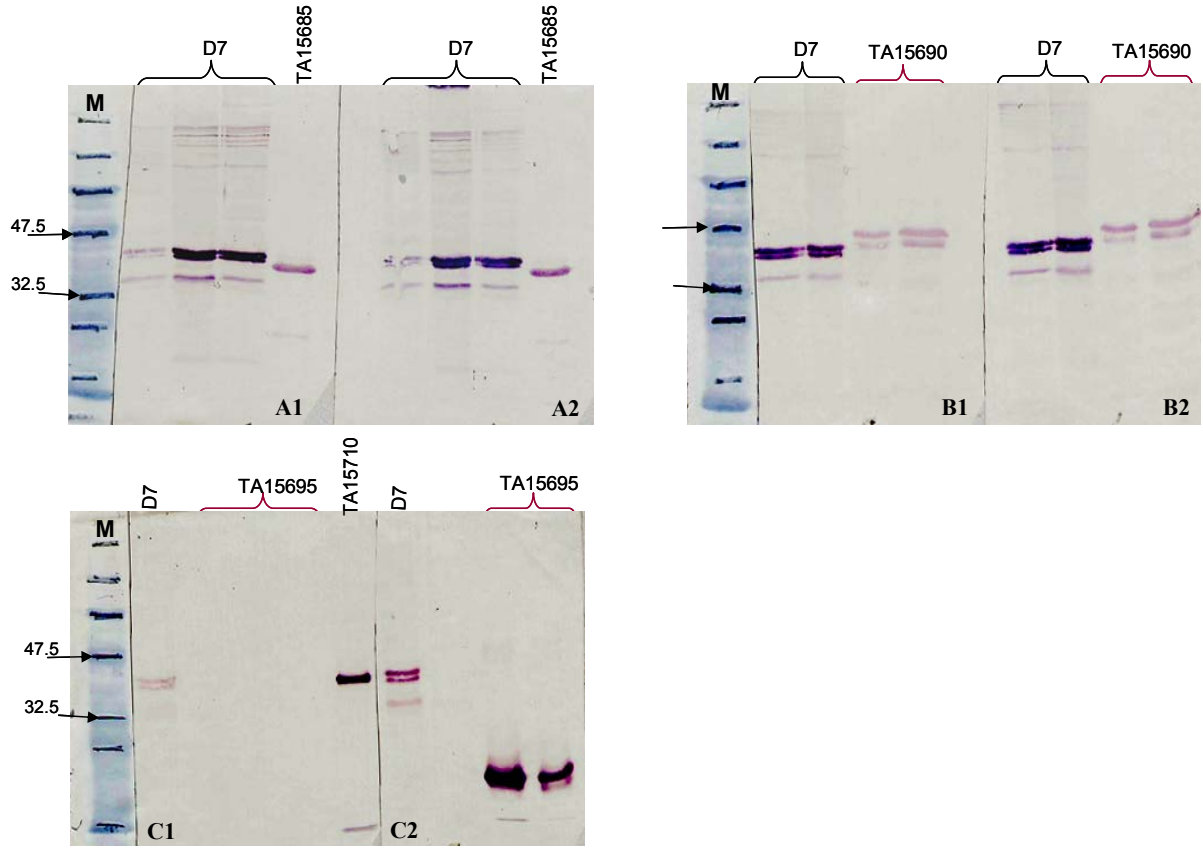
*Theileria annulata*'nın farklı allelleri tarafından kodlanan Ta9 ile Ta9.4 rekombinant proteinleri klonlandıktan sonra dizilim analizleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar amino asit düzeyinde clustalX (2.0) programı kullanılarak birbirleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 2.B.9). Ta9'un farklı alleller arasında 335–391. amino asitler arasında uzunluk farklılıkları gösterdiği, farklı alleller arasında ilave amino asitlerin özellikle proteinin PQ (Prolin ve Glutamin) zengin merkezi kısmında toplanmış ve *T. parva* genomundaki ortolog genlerde de 334-369. amino asitler arasında benzeri kalıba rastlanılmıştır (Şekil 2.B.9, A). Ta9.4 proteininin farklı coğrafik bölgeler (Tunus, İran, Mısır, Hindistan, Diyarbakır, Ankara) ile aynı bölgenin farklı yörelerine (Koçarlı, Yenihisar, Dalama, Hacıali Obası, Akçaova) ait izolatları arasında özellikle 140–230. amino asitler arasında uzunluk farklılıkları gösterdiği ve ilave amino asitlerin özellikle proteinin merkezi kısmının N ve C terminale yakın bölgelerinde yoğunlaştığı gözlenmiştir (Şekil 2.B.9, B ve Şekil 2.B.10).



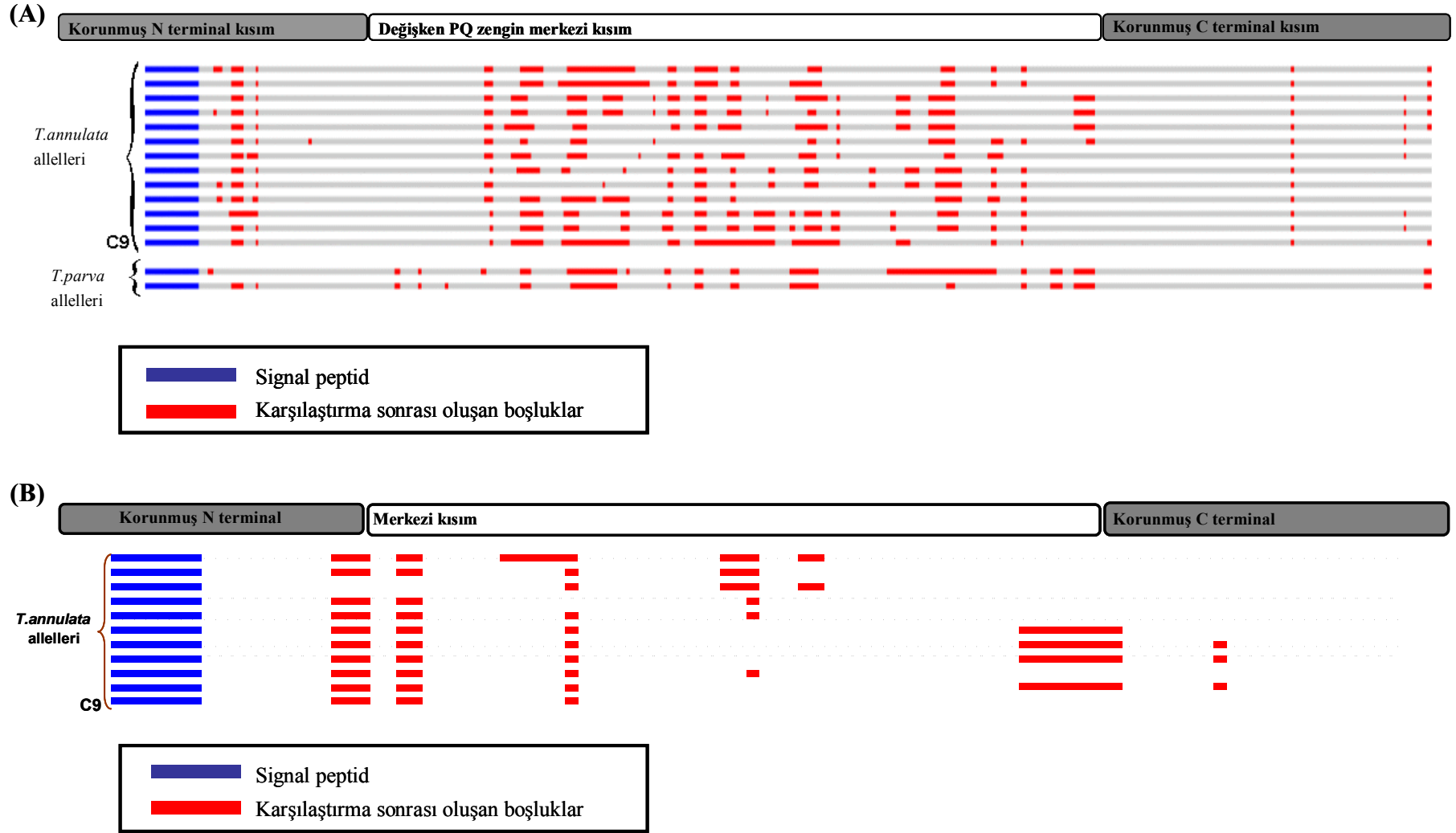
**Resim 2.B.7.** TA15710 (Ta9.4) ve TA15705 (Ta9) rekombinant proteinleri ile yapılan bloklama deneyinin Western blot sonuçları. (A); D7, TBL ekstraktları ile Ta9 ve TA15710 rekombinant proteinlerine karşı oluşan bağışık yanıtın 48C RES 42. gün serumu, Ta9 rekombinat rekombinant proteini ile bloklanmış 48C RES 42. gün serumu (B) ve TA15710 rekombinat rekombinant proteini ile bloklanmış 48C RES 42. gün serumu (C). Bordo ok D7 ekstraktlarında Ta9.4 rekombinant proteini ile bloke edilen  $\approx 44$  kDa ağırlığındaki bantı, yeşil renkli ok D7 ekstraktlarında Ta9.4 rekombinant proteini ile bloke edilen  $\approx 46$  kDa ağırlığındaki bantı göstermektedir. M; moleküler protein belirleyici (Bio-Rad, İngiltere).



**Resim 2.B.8.** Enfekte D7, TBL ile enfekte olmayan BL20 hücre ekstraktlarına karşı bloklanmamış 48C RES 42. gün serumu (A), Ta9 (B) ve Ta9.4 (C) rekombinant proteinleri ile bloklanmış 48C RES 42. gün serumu kullanılarak yapılan western blot sonuçları. Bordo ok Ta9 rekombinant proteini ile bloklanmış serum (B) kullanılarak yapılan blotlamada D7 ekstraktlarında bloke edilen  $\approx 46$  kDa ağırlığındaki bantı, yeşil renkli oklar Ta9.4 rekombinant proteini ile bloklanmış serum (C) kullanılarak yapılan blotlamada D7 ve TBL ekstraktlarında bloke edilen  $\approx 44$  kDa ağırlığındaki bantı göstermektedir. M; moleküler protein belirleyici (Bio-Rad, İngiltere).



**Resim 2.B.9.** TA15685, TA15690 ve TA15695 rekombinant proteinlerine ait western blot sonuçları. (A1 ve A2); TA15685 rekombinant proteinine karşı 48C RES 28. (A1) ve 42. gün (A2) bağışık serumları kullanılarak yapılan western blot sonucu. (B1 ve B2); TA15690 rekombinant proteinine karşı 48C RES 28. (B1) ve 42. gün (B2) bağışık serumları kullanılarak yapılan western blot sonucu. (C1 ve C2); TA15695 rekombinant proteini ile bloklanmış (C1) ve bloklanmamış (C2) bağışık serum ile yapılan westren blot sonuçları. M; moleküler protein belirleyici (Bio-Rad, İngiltere).



Şekil 2.B.9. *Theileria annulata*'nın farklı allelleri tarafından kodlanan Ta9 (A) ve TA15710 (B) proteinlerinin amino asit düzeyinde karşılaştırılması.

Koçarlı MDPDGSEPEKSDSGIRFYGDGEPVFTILRLTPEEANILKELLESYQECVSKSGSKPSDDPKPDLGI IRRDGDGNPLFLQTHEVTQQEADILKWVLQNHDPKPDFSAPPEERPPPY  
Tunus MDPDGSEPEKESGIRFYGDGEPVFRITLKLTTTEEAKILKELLTSYQECVSKSGSKPSDDPKPDLGI IRRDGDGNPLFLQTHEVTKEEAEILKWVLQNHDPKPDFSAPPEERPPPY  
D.bakır MDPDGSEPEKNEGSRFYGDGDPVFGTTLRLTTEEANILRELLKSYQECVSKSGSKPSDDPSDPGLIRRDGDGNPLFLQTHEVTREEAEILLEWLLKNHDPKPDFSAPPEERPPPY  
Yenihis MDPDGSEPEKNEGSRFYGDGEPVFTILKLTTTEEATILKELLSYQKSIKCSKSPDTPDGPDLGLIRRDGDGNPLFLQTHEVTQQEAKILLEWLLKNHDPKPDFSAPPEERPPPY  
Dalama MDPDGSEPEKNEGSRVLYGDGDPVFTTTTLTLPQEANILNELLSYQECVSKSSKPTDDPGPDLGLIRRDGDGNPLFLQTHEVTREEAEILKWLLQNHDPKPDFSAPPEERPPPY  
Gharb MDPDGSEPEKSDSGIRLYGDGDPVFTTTTLKLTPPEANILKDLLVSYQECVSKSGSKPSDDPKPDLGI IRRDGDGNPLFLQTHEVTQEEAEILSWLLKNHDPKPDFSAPPEERPPPY  
Genedb MDPDGSEPEKSDSGIRLYGDGDPVFTTTTLKLTPPEANILKDLLVSYQECVSKSGSKPSDDPKPDLGI IRRDGDGNPLFLQTHEVTQEEAEILSWLLKNHDPKPDFSAPPEERPPPY  
HAO MDPDGSEPEKSDSGIRLYGDGDPVFTTTTLKLTPPEANILKDLLVSYQECVSKSGSKPSDDPKPDLGI IRRDGDGNPLFLQTHEVTQEEAEILSWPLKNHDPKPDFSAPPEERPPPY  
Iran MDPDGSEPEKSDSGIRLYGDGDPVFTTTTLKLTPPEANILKDLLVSYQECVSKSGSKPSDDPKPDLGI IRRDGDGNPLFLQTHEVTQEEAEILSWPLKNHDPKPDFSAPPEERPPPY  
Aova MDPDGSEPEKSESGIRLYGDGDPVFGTTLKLTPPEANILRQLLESYQECVCKCSSKPPDVPGLIRRDNDGNPLFLQTHEVTKEEGEILKWLLKNHDPKPDFSAPPEERPPPY  
Ode MDPDGSEPEKSESGIRFYGDGEPVFGTTLKLTPPEANILKDLLVSYQKSLKCSSKPSDDPKPDLGLIRRDGDGNPLFLQTYEVTREEAEILSWLLKNHDPKPDFSAPPEERPPPY  
\*\*\*\*\* .:\*\*\*: \* \*\*\*\*:\*\*\* \* \* \*\* .:\*\*\*.\*\*\*.:\*\* \*\*\*\*: .:.\*.\*\*\*.\* \* \*\* \*:\*\*\*\*.\*\*\*\*:\* \* :\*\*\*\*:.\*. :.\* \* :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\*

Koçarlı YPGPYQTPGPSAPPDPSYFQSGYG----GYMP--QGSYGHPT-----DGYGYVPGPYGQPPYPYVVP-----DPY---GATGGYGAGATGGAGGYGTSWPQGPTAPEGDPSPG  
Tunus YPGPYQTPGPSAPPDPSYFQSGYG----GYGP--QGPYGHQSGAGYGA-PGYGPYFPGGYGQQIPGPYSP-----YPYDAEGATGGYGAGATGGAGGYGTSWPQGPTAPEGDPSPG  
D.bakır SPGPYPTPGPSAPPDPSYFQSGYQPTPGYGPYFPGGYGHPGGAGYGA-QGYGYVPGPYGQPPYPYVVP-----DPY---GATGGYGAGATAGAGGYGTSWGQPTAPEGDPSPG  
Yenihis SPGPYPTPGPSAPPDPSYFQSGYG----GYMP--LGPYGHGAAGYGTSGGYGPYVPGPYGQPTPGPYAYPQQ--GPYGAEGATGGYGAGATGGAGGYTSPWPQGPTAPEADPYGP  
Dalama SPGPYQTPGPSAPPDPSYFQSGYG----GYGP--QGPYGHQSGAGYGA-QGYGYVPGGYGQPGPYPQGPAYPP--GPYGAEGATGGYGAGATGGAGGYTSPWPQGPTAPEADPYGP  
Gharb SPGPYLTPGPSAPPYPIETPGGYG----GYMS--QGPYQPSGAGYGA-PGYGPYFPGGYGQQTPGTYPYPYPQQGPYGAEGATGGYGGGATGGAGGYGTSWGQVPSAPEADPS--  
Genedb SPGPYLTPGPSAPPYPIETPGGYG----GYMS--QGPYQPSGAGYGA-PGYGPYFPGGYGQQTPGTYPYPYPQQGPYGAEGATGGYGGGATGGAGGYGTSWGQVPSAPEADPS--  
HAO SPGPYLTPGPSAPPYPIETPGGYG----GYMS--QGPYQPSGAGYGA-PGYGPYFPGGYGQQTPGTYPYPYPQQGPYGAEGATGGYGGGATGGAGGYGTSWGQVPSAPEADPS--  
Iran SPGPYLTPGPSAPPYPIETPGGYG----GYMS--QGPYQPSGAGYGA-PGYGPYFPGGYGQQTPGTYPYPYPQQGPYGAEGATGGYGGGATGGAGGYGTSWGQVPSAPEADPS--  
Aova SPGPYQTPGPSAPPDPSYFQSGYG----GYGP--QGPYGHQSGAGYGA-QGYGYVPGGYGQPGPYPQGPAYPQ--GPYGAEGATGGYGGGATGGAG--YGTSPWPQGPTAPEADPYGP  
Ode SPGNYPTPGPSAPPDPSYFQSGYG----GYMP--QGPYQPSGAGYGA-PGYGPYFPGGYGQQTPGTYPYPYPQQGPYGAEGATGGYGAGATGDAG--YGTSPWPQGPTAPEGEP  
\* \* \* \*\*\*\*\* \* .\*\*\* \*\* . \* \*\* : \*\*\* \* .\*\* \*\*\* \* . \* \* \*\*\*\*\* .\*\*\*. \*\* \* .\*\* \* \* :\*\*\*. :\*

Koçarlı SDPSGPSGVSTPGGRLKLVPLDPKVEQCGFYEVLEYNLPKGKGGKHRRYRVAEGFGISTVRYAGVDVWMSGPHHAIEVILIGAGTTTCKIDVKLSNGSRLRFKRGGKKNPKWKRDIEKQ  
Tunus SDPSGPSGVSTPGGRLKLVPLDPKVEQCGFYEVLEYNLPKGKGGKHRRYRVAEGFGINVVTYAGIEVWKMSPHHATEVVLIGAGTGTKKIDVKLSNGTRVRFRRDGRKPKWKRDIEKQ  
D.bakır SDPTGPSEVSTPGGRLKLVPLDPKVEQCGFYNVFEYKLPQGKGGKHRRYKPNDCGFGISTVTYAGIEVWKMSPHHATEVILIGAGTGTKKIDVKLSNGTRVRFKKGKKNPKWKRDIEKQ  
Yenihis SDPPGPSGVSTPGGRLKLVPLDPKVEQCGFYNVFEYKLPQGKGGKHRRYKPNDCGFGISTVTYAGIEVWKMSPHHATEVILIGAGTGSKKIDVKLSNGSRMRFRKRGGKKNPKWKRDIEKQ  
Dalama SDPPGPSGVSTPGGGLRLVPLDPKVENECGLYEVLEYNLPKGKGGKHRRFRPNCGFGISTVTYAGIEVWKMSPHHATEVVLIGVAGTGKMDVKLSNGTRVRFKKGKKNPKWKRDIEKQ  
Gharb ----GPSGVSTPGAGGLRLVHLDKVENECGLYEVLEYNLPKGKGGKHRRYKPNDCGFGIRMVTYAGVWVWKMMDGQHHATEVTLIGVGTGNKKIDVKLSNGTRVRFKRGGKDKQWKRDIEKQ  
Genedb ----GPSGVSTPGAGGLRLVHLDKVENECGLYEVLEYNLPKGKGGKHRRYKPNDCGFGIRMVTYAGVWVWKMMDGQHHATEVTLIGVGTGNKKIDVKLSNGTRVRFKRGGKDKQWKRDIEKQ  
HAO ----GPSGVSTPGAGGLRLVHLDKVENECGLYEVLEYNLPKGKGGKHRRYKPNDCGFGIRMVTYAGVWVWKMMDGQHHATEVTLIGVGTGN--KIDVKLSNGTRVRFKRGGKDKQWKRDIEKQ  
Iran ----GPSGVSTPGAGGLRLVHLDKVENECGLYEVLEYNLPKGKGGKHRRYKPNDCGFGIRMVTYAGVWVWKMMDGQHHATEVTLIGVGTGN--KIDVKLSNGTRVRFKRGGKDKRWRKRDIEKQ  
Aova SDPSGPSGVSTPGAGGLRLVHLDKVENECGLYEVLEYNLPKGKGGKHRRYKPNDCGFGVIRMVTYAGVWVWKMMDGQHHATEVTLIGVGTGNKKIDVKLSNGTRVRFKRGGKDKQWKRDIEKQ  
Ode SDPPGPSGVSTPGGGLRLVHLDKVENECGLYEVLEYNLPKGKGGKHRRYKPNDCGFGINVVTYAGIEVWKMSPHHATEVVLIGAGTGTKKIDVKLSNGTRVRFKKGKKNPKWKRDIEKQ  
\*\*\* \*\*\*\*\* \* \* :\*\* \*\* :\*\*\*: \*\* : :\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*: : \*\*\*: \* \*\*\*\*: \* \* . \* \* \*\*\*\* \* \* \* \* . : \* :\*\*\*\*\*: \* :\*\*\*: . \* \* \*\*\*\*\*

**Şekil 2.B.10.** *Theileria annulata*'nın farklı allelleri tarafından kodlanan TA15710 proteinin amino asit düzeyinde custalX (2.0) programı kullanılarak karşılaştırılması. Karşılaştırılan amino asit dizilimlerdeki tamamı ile korunmuş bazlar '\*' ile, güçlü gruplar arasında tamamı ile korunmuş amino asitleri içeren alanlar '!' ile, zayıf gruplar arasında tamamı ile korunmuş amino asitleri içeren alanlar '.' ile ve karşılaştırılan amino asitler arasındaki boşluklarda '-' ile belirtilmiştir.

### 2.B.3. Tartışma

*Theileria annulata* yüzey proteini (TaSP), *T. parva* genomunda bulunan polimorfik immunodominant molekülünün (PIM) ortoloğu olan bir proteindir. TaSP molekülü, PIM'e benzer olarak haploid parazit genomunda tek kopyalı bir gen tarafından kodlanan ve parazitin makroşizont ile sporozoit dönemlerinde sentezlenen bir proteindir (Schnittger ve ark 2002). TaSP molekülü, PIM'e nazaran daha küçük (315 amino asit) olup, 36 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. TaSP ile PIM arasında %55 düzeyinde amino asit benzerliği (N ve C terminalinde %93 ve merkezi bölgede %10) bulunduğu ve PIM'e analog olarak TaSP'in merkezi bölgesinde yer alan amino asitlerin çoğunlukla negatif yüklü olduğu belirlenmiştir (Schnittger ve ark 2002). Proteinin N terminalinde ilk 19 amino asitten oluşan signal dizilim ve C terminalinde üç adet transmembran alan bulunduğu (Şekil 2.B.3) ve proteinin N terminal ve merkezi kısımlarının hücre dışında lokalize olduğunu yapılan biyoinformatik incelemeler sonucunda belirlenmiştir (Schnittger ve ark 2002).

TaSP molekülünün membran topolojisinin belirlenmesi amacıyla TopPred (Claros and von Heijne 1994) bilgisayar programı kullanılarak yapılan incelemelerde molekülün N terminal kısmında parazit sitoplazması, C terminalinde ise konak hücre sitoplazmasına doğru yönelmiş olduğu, birinci ve ikinci transmembran alanlar arasında kalan polimorfik merkezi kısmının ise konak hücre sitoplazmasıyla ilişkili olup, toplamda üç transmembran alan içeren bir membran proteini olduğunu gösterilmiştir (Şekil 2.B.4) (Seitzer ve ark 2007). TaSP molekülünün şizontlarla enfekte hücrelerdeki yerleşim yerinin belirlenmesi amacıyla proteinin merkezi polimorfik kısmına (26–157. amino asitler arası) kısmına (Şekil 2.B.5) karşı geliştirilen antiserum kullanılarak yapılan incelemelerde molekülün parazit çekirdeği ile makroşizontların yüzeyinde yoğunlaştığı görülmüş ve proteinin muhtemelen parazitin dış yüzeyine yerleşmiş olduğu belirtilmiştir (Schnittger ve ark 2002, Seitzer ve ark 2007).

*Plasmodium falciparum* sporozoitlerindeki birincil immunodominant bant olan circumsporozoite (CS) protein N- ve C- terminal bölgelerinde korunmuş bir protein iken merkezi kısmı polimorfik olup üç peptidli tekrarlar içermekte (Dame ve ark 1984) ve sporozoitlere karşı gelişen antikörlerin neredeyse tümünün bu tekrarlı alanlara karşı geliştiği belirtilmiştir (Zavala ve ark 1985). PIM proteininde bulunan tekrarlı bölgelerinde benzer şekilde tekrarlı bölgelerde immunojenik epitopların varlığı bildirilmiştir (Toye ve ark 1996). Aynı zamanda *P.falciparum*'un CS proteini konak bağışıklık sisteminden korunmada rol oynamakta, bununla birlikte parazitin reseptör–ligand aracılı konak hücreye girişinde de önemli olduğu bilinmektedir (Rathore ve ark 2000). Buna benzer bir fonksiyonda PIM

proteini içinde öne sürülmektedir (Toye ve ark 1995). TaSP molekülü genel yapısı itibari ile PIM'e benzerlik göstermesine karşın, TaSP moleküle ait merkezi bölge daha kısadır ve karakteristik tekrarlı motifler bulunmamaktadır.

*Theileria annulata* ile enfekte sekiz farklı sığır serumu kullanılarak yapılan bir çalışmada (Schnittger ve ark 2002), molekülün üzerindeki B hücre epitoplarına karşı konağın geliştirdiği güçlü humoral bağışık yanıtı bağli olarak tüm serumlar rekombinant protein ile kuvvetli reaksiyon göstermiştir. Proteine karşı konakta görülen güçlü humoral bağışık yanıtı bakılarak molekülün *T. annulata*'nın immunodominant makroşizont antijeni olduğu ileri sürülmüştür (Schnittger ve ark 2002). Bunun yanında TaSP molekülüne karşı doğal enfekte ve aşılı hayvanlarda oluşan bağışık yanıt arasındaki ilişkiyle ilgili bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, sporozoitlerle enfekte hayvanlara ait serum örnekleri kullanılarak yapılan Western blot sonucunda en güçlü humoral bağışık yanıt 21A no'lu hayvandan elde edilen serum örneğinde (Resim 2.B.1, A1) gözlenirken, diğer hayvanlara (23B, 48C ve 897A) ait serum örneklerinde 21A'ya nazaran daha düşük humoral yanıt oluşmuştur (Resim 2.B.1, A2, 3 ve 4). 21A ve diğer hayvanlardan elde edilen serumlarda TaSP molekülüne karşı oluşan farklı düzeylerdeki bağışık yanıt aynı zamanda TaA2 ve D7 ekstraktlarındaki dominant bantların yoğunluklarına da yansımıştır. Örnek olarak TaSP molekülüne karşı en güçlü humoral yanıt gözlenen 21A serumu  $\approx 32$  kDa ağırlığındaki ortak bantı belirlerken, diğer serum örnekleri tarafından belirlenen 36–42 kDa aralığındaki diğer dominant bantlar ile çok zayıf düzeyde reaksiyon göstermiştir.

Bunun yanında, aşılı hayvanlardan elde edilen serumlar da TaSP molekülüne karşı genelde yüksek düzeyde bir yanıt olduğu görmüştür. Ancak kullanılan serum örnekleri arasında TaSP molekülüne karşı, sporozoitler ile enfekte edilen hayvanlara benzer şekilde, farklı düzeylerde bağışık yanıt görülmüştür. Bu çalışma sonucunda hem aşılı hemde sporozoit ile enfekte serum örnekleri TaSP rekombinant protein ile belirtildiğinin aksine güçlü humoral bağışık yanıtı bağli kuvvetli reaksiyon oluşturmayıp, hayvanlar arasında değışen derecelerde reaksiyon göstermiştir. TaSP rekombinant proteini ile güçlü reaksiyon gösteren serum örnekleri hücre ekstraktlarındaki dominant bantlardan sadece  $\approx 32$  kDa'luk bant ile güçlü reaksiyon gösterirken diğer dominant bantlar ile daha zayıf bir reaksiyon göstermiştir. Bunun yanında TaSP rekombinant proteini ile dha zayıf reaksiyon gösteren serum örnekleri hücre ekstraktlarında 32–42 kDa aralığındaki dominant bantlar ile güçlü reaksiyon göstermiştir. TaSP rekombinant proteinine karşı gelişen reaksiyon ile hücre ekstraktlarındaki dominant bantlarla oluşan reaksiyon arasındaki ters yönlü ilişkinin olması oldukça kayda değerdir. Belli bir antijene karşı gelişen antikör miktarı ve humoral sistem tarafından yanıt oluşturulan farklı



antijenler düşünülürken bireyler arasında parazite karşı gelişen bağışık yanıtta tam anlamıyla bir benzerlik beklemek olası değildir. Parazit ve konak popülasyonlarındaki genetik çeşitlilik, parazit proteomunun kompleks oluşu ve özgül antikor yanıtın oluşum aşamalarındaki değişkenlikler bireyler arasında oluşan bağışık yanıtta farklılıklara yol açmaktadır. Bireyleri tek bir antijene karşı gelişen reaksiyona bakarak sınıflandırmak yada belli bir farklılık olduğunu düşünmek, bağışık yanıtın nasıl geliştiğinin anlaşılmasında etkili olabilecek parazite ait diğer antijenlerine karşı bireysel reaksiyonların oluşumu altında yatan benzerlik ve/veya farklılıkların göz ardı edilmesine yol açmaktadır (Julian ve ark 2007). Çalışmada kullanılan örnek sayısı fazla olmasada serum örnekleri arasında kayda değer ölçüde bir farklılık görülmüştür. Bununla birlikte elde edilen verilerin yapılacak çalışmalar ile daha fazla örneğe dayandırılması ve humoral yanıtta farklılıkları tek bir antijene karşı değilde birçok antijeni içerisine alan proteom mikroarray analizleri şeklinde yapılması önem taşımaktadır.

Bu çalışmada kullanılan ve 19.1 kDa moleküler ağırlığa sahip rekombinant TaSP molekülü yapılan Western blot analizlerinde daha yüksek moleküler ağırlıkta ( $\approx 47$  kDa) bant oluşmuştur. Amino asit zincirlerinde yüksek oranda prolin' den zengin çift peptidli tekrarlar (X-Pro; özellikle Glu-Pro ve Gln-Pro gibi) sahip proteinlerde konformasyonel olarak zincir yapısı genişlemekte ve bu da proteinlerin elektroforez esnasında daha yavaş ilerlemesine yol açmaktadır (Brewer ve ark 1990). Benzer durum TaSP molekülünün polimorfik merkezi bölgesine ait rekombinant proteini kullanılarak yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir (Schnittger ve ark 2002). Bu çalışmada, rekombinant olarak üretilen TaSP molekülünün merkezi polimorfik kısmının yapılan dizilim analizi sonucunda üretilen proteinin veri tabanında kayıtlı TaSP proteinine ait polimorfik merkezi bölgesi ile %100 homoloji göstermiştir. Bu çalışmada kullanılan rekombinant TaSP proteininin, daha önceki çalışmalarda kullanılan 14 kDa ağırlığındaki TaSP rekombinant proteinine (Schnittger ve ark 2002) göre, blotlamalarda  $\approx 5$  kDa'luk bir fark oluşturması N ve C terminalinde yer alan sırasıyla GPFLPLD ile VCHGKHHDYDSDGKESKSDHDKRPK amino asit ilavelerine bağlıdır. Bu çalışmaya benzer şekilde, TaSP molekülün polimorfik merkezi kısmına karşı geliştirilen TaSP antiserumunun Western blotlarda makroşizont hücre ekstraktlarında, TaSP molekülünün belirlenen 33 kDa'luk (signal dizilim hariç) moleküler ağırlığına karşın, 42 kDa ağırlığında bir bant ile reaksiyon göstermiştir (Schnittger ve ark 2002).

Birbirlerine benzer yapıları peptid alanları içeren proteinler arasında, herhangi bir proteine karşı geliştirilen antiserum homolog olan diğer peptid bölgesi ile çapraz reaksiyon verebilmektedir. Malarya daki circumsporozoit (CS) ve membran antijeni olan CRA

proteinlerine ait tekrarlı alanlarda bulunan epitoplarda çapraz reaksiyonun varlığı bildirilmiştir (Anders 1986). *T. parva*'ya ait PIM ve p150 proteinlerinde (Baylis ve ark 1993, Toye ve ark 1995b, Skilton ve ark 1998) olduğu gibi, birbirleri ile düşük düzeyde dizilim benzerliği gösteren ancak aralarında benzer yapıya sahip tekrarlı motifler (QP motifleri gibi) bulunan proteinler konak bağışıklık sistemi tarafından immunojenik olarak algılanmakta ve bu tür proteinler arasında çapraz reaksiyonlar görülebilmektedir. Rekombinant PIM molekülüne karşı geliştirilen monoklonal antikoru (mAb 8), PIM üzerinde mAb 8 epitoplara bulunan peptid dizilimi ile p150 proteinindeki tekrarlı alanda bulunan çiftli dizilimler arasındaki homolojiye bağlı olarak, hem rekombinant PIM hemde rekombinant p150 proteinleri ile reaksiyon vermiştir (Skilton ve ark 1998). Dizilim benzerlikleri ve bu türlü tekrarlı peptid alanları moleküller arasındaki benzer fonksiyonlara işaret edebildiği gibi, PIM ve p150 gibi ortak bir atadan da kaynaklanabilmektedir (Skilton ve ark 1998). Bu çalışmada TaSP antiserumunun Diyarbakır, Aydın ve Gharb izolatlarında özgül 42 kDa ağırlığındaki bantın yanında bir ikinci bant daha belirlenmesi iki şekilde açıklanabilir; (i) iki protein arasında muhtemelen benzer yapıya sahip alanların bulunması, (ii) protein ekstraktlarının (antijenlerin) hazırlanışına bağlı olarak protein üzerinde normalde bulunmayan bir peptid bölgenin doğasının değişmesine bağlı (Van Regenmortel 2006) antiserum tarafından bağlanma bölgesi olarak algılanması. İkinci açıklamada belirtilen hatanın oluşmuş olması aynı zamanda TaSP antiserumunun özgül olarak bağlandığı 42 kDa'luk protein üzerindeki epitop bölgelerinin doğasının değişmesine yol açacağından antiserumun bu proteine bağlanma olasılığında olmayacaktır. TaSP molekülüne özgül olarak bağlanan, *T. annulata* makraşizontlarına karşı geliştirilen 1C7 monoklonal antikoru (Shiels ve ark 1986) ile yapılan Western blotlarda herhangi bir bant belirlenemezken, TaSP antiserumunun, 1C7 kullanılarak yapılan immunpresipitasyon sonucu elde edilen antijen ile, hücre ekstraktlarında TaSP molekülü ile aynı moleküler ağırlıkta bantı belirlediği bildirilmiştir (Renneker ve ark 2008). Bu da 1C7 monoklonal antikorunun hücre ekstraktlarından TaSP antiserumunu presipite edebildiğini, ancak farklı yöntemle hazırlanan hücre ekstraktlarında TaSP molekülünü tanıyamadığını göstermektedir. Bununla birlikte TaSP ortoloğu olan PIM ve p150 proteinleri arasında da çapraz reaksiyon görülüyor olması (Skilton ve ark 1998) bu çalışmada üç izolatta belirlenen farklı moleküler ağırlıktaki ikincil bantları daha iyi açıklamaktadır. Diğer izolatlarda antiserumun sadece tek bir bant oluşturması farklı genotipteki populasyonlarda değişken protein ekspresyonu sonucunda çapraz reaksiyon görülen proteinin daha az sentezlenmesinden kaynaklanmış olabilir. Bunun yanında, TaSP molekülüne ait amino asit dizilimleri karşılaştırıldığında sadece farklı coğrafik bölgeler arasında değil aynı zamanda tek izolata ait farklı klonlar arasında da farklılıklar görülmüştür.

Farklı izolatlara ait TaSP'nin ilk 37 ve son 121 amino asitlik kısmının iyi şekilde korunmuş olmasına karşın, 154–171 amino asitlerde arasındaki merkezi bölgesinde polimorfizm ve büyüklük farkları bulunmuştur (Schnittger ve ark 2002; Awadia ve ark 2008). *T. parva*'nın makroşizont döneminde sentezlenen PIM molekülünde parazite ait farklı izolatlar arasında uzunluk yönünden polimorfizm göstermektedir (Toye ve ark 1991, Baylis ve ark 1993, Toye ve ark 1995a). TaSP molekülü bu genel yapısı itibari ile PIM'e benzerlik göstermesine karşın, TaSP molekülüne ait merkezi bölge daha kısa olup, alleller arasındaki polimorfizm daha azdır ve karakteristik tekrarlı motifler bulunmamaktadır. Araştırmacılar tarafından farklılığın mutasyon ve intragenik rekombinasyonlar sonucu geliştiği tahmininde bulunulmuştur (Schnittger ve ark 2002).

Bu güne kadar ki çalışmalarda, TaSP rekombinant proteinine karşı geliştirilen antiserumun *T. parva* ve *T. annulata* arasında herhangi bir çapraz reaksiyon verip vermediğine ilişkin bir veriye rastlanmamıştır. Bu çalışmada, TaSP antiserumunun *T. parva* ekstraktlarında 32–42 kDa aralığında üç bant belirleyerek türler arasında çapraz reaksiyon vermiştir (Resim 2.B.2, A3). RES 42. gün serumu ile türler arasında 34 ve 42 kDa moleküler ağırlıktaki bantlar belirlenememiştir. Bağışık serum sadece *T. parva* ve *T. annulata* türleri arasında ortak olan  $\approx 32$  kDa ağırlığındaki bant ile çapraz reaksiyon göstermiştir (Resim 2.B.2, B3). TaSP antiserumu *T. parva* ekstraktlarında birden fazla bant belirlemesi; TaSP ortoloğu olduğu belirtilen PIM ve PIM ile benzer tekrarlı motiflere sahip p150 veya benzer motifler içeren bir başka protein ile çapraz reaksiyon göstermiş olabilir. p150 proteininin 150 kDa (Genbank No; L43230) moleküler ağırlığa sahip olması blotlamalarda görülen bantların p150 proteini olma olasılığını ortadan kaldırmaktadır. Bununla birlikte 60 kDa'luk PIM proteini (Genbank No; L41833) *T. parva*'nın farklı izolatları arasında 42–100 kDa aralığında farklılıklar gösterebilmektedir. Çalışmada kullanılan Muguga izolatında görülen 42 kDa'luk bant TaSP ortoloğu olan PIM proteini olarak düşünülebilir. Ancak *T. parva* ekstraktlarında TaSP antiserumunun belirlediği diğer iki bantın yapılacak olan çalışmalarla identifikasyonu ve bu proteinlerin muhtemel benzer peptid motifleri içermelerinden mi yoksa TaSP homoloğu olan başka proteinlerinde bulunmasından mı kaynaklandığı belirlenmelidir.

TaSP antiserumu *T. lestoquardi* ekstraktlarında ise 32–34 kDa aralığında iki bant ile çapraz reaksiyon göstermiştir (Resim 2.B.2, A3). Çin'de *Theileria spp.* ile enfekte küçük ruminantlardan alınan serum örnekleri Western blotlarda TaSP rekombinant proteini ile çapraz reaksiyon göstermiştir ve bunun küçük ruminantlarda görülen *Theileria spp.* (Çin) türüne ait TaSP homoloğu bir proteinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Miranda ve ark 2004). Daha sonraki dönemde *Theileria spp.* (Çin) merozoitlerine ait cDNA'ları kullanılarak

yapılan PCR ile TaSP ile %94 benzerlik gösteren TcSP (Genbank No; DQ120058) molekülü identifiye edilmiştir (Miranda ve ark 2006). TaSP'a nazaran daha küçük olan TcSP molekülü (14 kDa) protein dizilimi üzerinde prolin den zengin çift peptidli tekraralara sahiptir ve yapılan blotlamalarda görülen  $\approx$ 34 kDa ağırlığındaki protein bantının TaSP ile gösterdiği benzerliğe (%94) bakılarak TcSP molekülü olma olasılığı yüksektir. Ancak, TcSP molekülünün klonlanarak tam fonksiyonunun belirlenmesi gereklidir.

*Theileria annulata*'nın farklı izolatlarına ait hücre kültürlerinden hazırlanan protein ekstraktları kullanılarak yapılan western blotlamalarda görülen dominant bantlar arasında hem yoğunluk hemde büyüklük yönünden farklılıklar tespit edilmiştir (Bakınız Resim 2.A.1). TaSP molekülü tek kopyalı bir gen olmasına karşın *T. annulata*'nın farklı izolatları arasında muhtemel mutasyon ve intragenik rekombinasyona bağlı olarak gösterdiği polimorfizm (Schnittger ve ark 2002, Awadia ve ark 2008) ile enfekte hayvanlardan elde edilen saha izolatlarında yapılan klonlama esnasında meydana gelen adaptasyon, gen ekspresyonundaki değişimler ve/veya enfeksiyonu oluşturan parazit popülasyonlarında yer alan farklı genotipik alleller (Oura ve ark 2003, İlhan 1999, Weir 2006) ile benzer yapılı tekrarlı motiflere sahip paralog proteinlere bağlı olarak Western blotlarda gözlenen dominant bantlardan bir yada bir kaçının immunodominant makroşizont antijeni olarak kabul edilen TaSP molekülü (Schnittger ve ark 2002) olma ihtimali bulunmaktadır. Farklı türlerde alternatif RNA eklemelerinin olduğu bilinmektedir (Ranson ve ark 1998, Kitayama ve ark 1999) ancak aynı türe ait farklı izolatlar arasında bu yönde bir bilgi bulunmamaktadır.

*Theileria annulata*'nın farklı izolatlarına ait hücre kültürlerinden hazırlanan protein ekstraktları ile deneysel enfekte hayvan serumları kullanılarak yapılan western blot sonuçlarında gözlenen dominant bantlardan bir yada bir kaçının immunodominant makroşizont antijeni olarak kabul edilen TaSP molekülü (Schnittger ve ark 2002) olup olmadığının belirlenmesi amacıyla bağışık serum rekombinant TaSP proteini ile bloklanmıştır. Bloklanmış serumda TaSP rekombinant proteinine karşı herhangi bir reaksiyon görülmezken, D7 makroşizont hücre ekstraktlarında dominant bantlar ile reaksiyon oluşmuştur (Resim 2.B.3, A ve B). Bu sonuçlar TaSP molekülünün önceki çalışmalarda belirtilen immunodominant makroşizont antijeni (Schnittger ve ark 2002) olmadığını göstermektedir.

İmmunopresipitasyon sonucunda elde edilen bantın mass spektrofotometrik analizleri ve mascot taraması sonucunda; sekans analizi için gönderilen protein bantında konak hücre kaynaklı yoğun kontaminasyona rastlanmıştır (Çizelge 2.B.1). Konak hücre kaynaklı yoğun kontaminasyon, ham ekstraktlar kullanılarak yapılan çalışmalarda proteinlerin

hücreye özgü kompartımanlar içerisinde yer alması yada amino asit diziliminde ER, golgi aygıtı veya mitokondrial motifler bulunması hücre içinde fonksiyonel olarak farklılık göstermesine yol açabilmekte ve bu tür proteinlerin izolasyonunda konak hücreye ait proteinlere rastlanılacağı belirtilmektedir (Holden ve Horton 2009). Oluşan kontaminasyona rağmen analiz sonucunda *T. annulata* Ankara C9 genomunda bulunan TA15705 geni tarafından kodlanan hipotetik proteinin ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) varlığı tespit edilmiştir (Çizelge 2.B.1). TA15705 geni 1008 bp uzunluğunda tek ekzona sahip, parazitin makroşizont döneminde sentezlenmekte ve haploid genomda bulunan ikinci kromozom üzerinde (Şekil 2.B.6) yer almaktadır. Kodlanan protein 35 kDa ağırlığında olup, N-terminal ucunda signal peptid içermektedir. *T. annulata* genomunda muhtemel gen duplikasyonuna bağlı TA15705 geninin de içerisinde bulunduğu ve toplamda beş genden oluşan paralog gen ailesi bulunmaktadır (Şekil 2.B.6). Paralog genlerin tümü tek bir ekzona sahip olup, ikinci kromozom üzerinde yer almakta ve genlerin hepsi makroşizont döneminde sentezlenmektedir. Paralog proteinler arasında clustal X programı ile yapılan karşılaştırmada N terminalde 1–20. amino asitler arasında korunmuş signal dizilime sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 2.B.7). Ailede bulunan genler uzunlukları 175–357. amino asit arasında değişen, 19–37.9 kDa moleküler ağırlığa sahip proteinleri kodlamaktadır (Çizelge 2.B.2).

TA15705 tarafından kodlanan proteinin (Ta9) D7 ekstraktlarında western blotlamalarda görülen dominant bantlardan hangisi olduğunun belirlenmesi amacıyla yapılan bloklama deneyi sonucunda D7 hücre ekstraktlarında görülen  $\approx 46$  kDa ağırlığındaki banta özgü antikorlar Ta9 rekombinant proteini tarafından nötralize edilmiş ve bu bant bloklanmış membranlarda çok silik reaksiyon göstermiştir (Resim 2.B.5, B). Bloklanmış membranda aynı zamanda Ta9 rekombinant proteinine karşıda reaksiyon görülmesi serumda bulunan Ta9 proteinine özgü antikorların yeterli miktarda rekombinant protein ile bloklanamamasına bağlı tamamının nötralize edilememesinden kaynaklanmaktadır.

Paralog ailede bulunan TA15710 geni tarafından kodlanan Ta9.4 rekombinant proteinin Ta9 ile birlikte blotlamada en yüksek antikor yanıtın olduğu ikinci proteindir. Ta9.4 rekombinant proteini ile bloklanan serum örneği D7 ekstraktlarında görülen  $\approx 44$  kDa ağırlığındaki ikinci dominant protein bantına özgü antikorları nötralize etmiştir (Resim 2.B.6, A1). Ta9 ve Ta9.4 rekombinant proteinleri kullanılarak yapılan bloklama deneyleri sonucunda D7 hücre ekstraktlarında görülen  $\approx 44$  ve 46 kDa moleküler ağırlığa sahip iki bantı sırasıyla TA15710 ve TA15705 genleri tarafından kodlanan Ta9.4 ve Ta9 proteinleri olduğu belirlenmiştir (Resim 2.B.7, B ve C).

*Theileria annulata*'nın farklı allelleri tarafından kodlanan Ta9 ile Ta9.4 rekombinant proteinlerinin dizilim analizleri sonucunda Ta9'un *T. annulata*'nın farklı allelleri arasında 335–391. amino asitler arasında uzunluk farklılıkları gösterdiği, farklı alleller arasında ilave amino asitlerin özellikle proteinin PQ (Prolin ve Glutamin) zengin merkezi kısmında toplandığı ve *T. parva* genomundaki ortolog genlerde de 334 / 369.inci amino asitler arasında benzeri bir yapının görüldüğü (Şekil 2.B.9, A) belirlenmiştir. Ta9.4 proteininin farklı coğrafik bölgeler (Tunus, İran, Mısır, Hindistan, Diyarbakır, Ankara) ile aynı bölgenin farklı yörelerine (Koçarlı, Yenihisar, Dalama, Hacıali obası, Akçaova) ait izolatları arasında özellikle 140–230. amino asitler arasında uzunluk farklılıkları gösterdiği, bununla birlikte N ve C terminal bölgeler ile 140–230. amino asitler haricinde kalan bölgelerinde iyi derecede korunmuş olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.B.9, B ve Şekil 2.B.10).

Bu kısımda elde edilen sonuçlar doğrultusunda TaSP molekülünün D7 hücrelerine ait makroşizont ekstraktlarında bağışık serumlar ile belirlenen immunodominant bantlardan herhangi biri olmadığı tespit edilmiştir. TaSP molekülü immunodominant makroşizont antijeni olmasada yapılan çalışmalarda bu proteinin oldukça immunojenik olduğu, enfekte hayvan serumlarında bu proteine karşı iyi düzeyde bir humoral yanıt geliştiği ve ELISA yöntemi ile saha şartlarında enfekte hayvanların belirlenmesi amacıyla kullanılabilceği belirtilmiştir (Bakheit ve ark 2004c, Salih ve ark 2005a,b, 2007, 2009, Seitzer ve ark 2007). Bunun yanında makroşizont ekstraktlarında görülen  $\approx 44$  ve 46 kDa moleküler ağırlıktaki dominant bantların Ta9 ve Ta9.4 proteinleri olduğu ve bu proteinlerden özellikle Ta9'un merkezi polimorfik kısmının *T. annulata*'nın farklı allelleri arasında uzunluk farklılıkları gösteren PQ zengin bölge olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Ta9 ve Ta9.4 proteinlerinin ELISA yönteminde kullanılmaya değer proteinler olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte bu proteinlerin saha şartlarında enfekte hayvanların belirlenmesinde ne derecede kullanılabilir olduğu bilinmemektedir.

Daha önce ELISA yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda kullanılan TaSP molekülü (Bakheit ve ark 2004, Salih ve ark 2005a,b, 2007, 2009, Seitzer ve ark 2008) ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda D7 hücre ekstraktlarındaki dominant bantlardan ikisi olduğu belirlenen Ta9 ve Ta9.4 rekombinant proteinleri kullanılarak geliştirilen indirek ELISA yönteminin standardizasyonu ve saha şartlarında *T. annulata* ile enfekte hayvanların tespitinde kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar bir sonraki kısımda anlatılacaktır.

## 2.C. TaSP, Ta9 ve Ta9.4 Rekombinant Antijenleri Kullanılarak İndirek ELISA Testlerinin Geliştirilmesi

Tropikal theileriosis'in endemik olarak görüldüğü ülkelerde hayvanların hastalığa yakalanıp yakalanmadıklarının belirlenmesi amacıyla serolojik tanı yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Serolojik yöntemlerinin kullanılmasında amaç hastalığı atlatan ve/veya aşılı hayvanlarda *T. annulata*'ya karşı gelişen bağışık yanıtta oluşan antikörlerin belirlenerek hastalığın prevalansı hakkında bilgi edinmek ve/veya hastalığın kontrolünde kullanılan aşılamaların etkinliğinin, aşılanan hayvanların saha şartlarında oluşan tekrarlayan enfeksiyonlara karşı vereceği yanıtın belirlenebilmesidir. Kullanılan en yaygın serolojik tanı metodu indirekt floresans antikör (IFAT) testidir ve bu testte parazitin makroşizont ya da piroplasm dönemlerine ait antijenler kullanılmaktadır. IFA testi, *T. annulata*'nın prevalans çalışmaları ve aşılanmış hayvanlardaki antikör yanıtının belirlenmesinde yoğun olarak kullanılan bir testtir (Pipano ve ark 1974). IFA testinden ayrı olarak, komplement fikzasyon ve hemaglutinasyon inhibisyon testleri de *Theileria*'ya karşı oluşan antikörlerin belirlenmesinde kullanılmış, ancak özgüllüklerinin düşük olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadırlar (Norval ve ark 1992). IFA testinin mikroskopik bakıya göre daha iyi ve pratik bir yöntem olması, hastalığın endemik olarak görüldüğü ve diğer kan parazitlerine rastlanmayan bölgelerde oldukça iyi sonuç vermesi, testin hastalığın duyarlı ve özgül tanısında yaygın olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır. Bununla birlikte testin subjektif olması, *T. parva*, *T. buffeli*, *T. mutans*, *T. taurotragi* gibi diğer *Theileria* türleri ile *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale* ve *A. centrale* gibi diğer piroplasmalar ile belli derecelerde çapraz reaksiyon göstermesi (Burridge ve ark 1974) testin özgüllüğünü azaltan yönlerdir.

IFA testi parazitin farklı yaşam dönemlerinde ortak olarak gözlenen antijenler ile reaksiyon göstermesinden dolayı aşılanmış/re enfekte olmamış hayvanların ne aşılı/re enfekte nede doğal olarak enfeksiyonu atlatıp bağışıklık kazanmış hayvanlardan ayırımını yapamamaktadır (Knight 1998). Bununla birlikte, parazitlerin yaşam döngülerinde her aşamada sentezlenen farklı ve sadece o döneme özgü antijenler bulunmakta (Bkz. Bölüm 2.1. Genel Bilgi) ve bunlar o yaşam döneminde sentezlenerek parazitin ilgili yaşam dönemi için belirleyici bir rol oynayabilmektedir. *T. annulata*'nın farklı yaşam dönemleride özgül olarak parazit tarafından sentezlenen ve konak hayvanda humoral bağışık yanıt oluşturan antijenlerin belirlenmesi aşılı, doğal yolla enfeksiyona yakalanmış ve re enfekte hayvanların ayırımına olanak sağlayabilmektedir. Örnek olarak; sporozoitler ile oluşan doğal enfeksiyonlarda konak

bağışıklık sisteminde parazitin tüm yaşam dönemlerine (sporozoit, makroşizont, merozoit ve piroplasm) karşı değişik zamanlarda, farklı düzeylerde hücrel ve/veya humoral bağışık yanıt oluşur. Ancak, parazitin atenüye edilmiş ve piroplasm oluşturmadığı düşünülen (Pipano 1977) hücre kültürleri ile aşılınmış hayvanlarda konak vücudunda parazitin sporozoit, meroziot ve piroplasm dönemlerine karşı bağışık yanıt oluşmazken, aşılınmış hayvanlarda bağışıklık sistemi sadece makroşizont döneminde sentezlenen proteinler ile karşılaşp bunlara karşı yanıt oluşturmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda bu türlü hayvanların ayırımının yapılması hastalığa karşı geliştirilecek kontrol programlarının belirlenmesinde önem taşımaktadır. Bu amaçla kullanılan bir serolojik test olan enzim bağı immunosorbent testi (ELISA), son yıllarda Veteriner Hekimlikte hastalıkların tanısı ve epidemiyolojik çalışmalarda giderek yaygın şekilde kullanım alanı bulmuştur (Voller ve ark 1976).

ELISA, IFA testine nazaran daha duyarlı ve özgül oluşu, çok sayıda örneğin incelenmesine olanak vermesi ve ucuz olması ile daha avantajlıdır (Kemeny ve Chantler 1988). Tropikal theileriosis'e yakalanan hayvanlarda etkene karşı oluşan antikorların belirlenmesi amacıyla birçok çalışma yapılmış ve parazitin piroplasm, makroşizont dönemlerine ait işlenmemiş (ham) antijenler ayrı olarak ya da bir arada kullanılmıştır (Beniwal ve ark 1997, Gray ve ark 1980, Kachani ve ark 1992a, Sundar ve ark 1993, Reddy ve ark 1994, Beniwal ve ark 1997, Prasanth ve ark 1995). Ancak bu antijenler kullanılarak yapılan testler duyarlılık ve özgüllükleri yönünden tam olarak incelenememiştir. Kachani ve ark (1992) tarafından, ham piroplasm antijenleri kullanarak yapılan ELISA'nın, bağışık hayvanlardan alınan serum örnekleri ile hem şizontlardan hazırlanan antijenlere göre daha etkili olduğu hem de daha az özgül olmayan bağlanma gösterdiği bildirilmiştir. Bunun yanında, ham antijenler kullanılarak yapılan ELISA ile elde edilen sonuçların IFA testi ile elde edilenlere nazaran daha duyarlı, objektif, gerçekçi ve özgül olduğu bilinmektedir (Beniwal ve ark 1997). Ham haldeki çözünür piroplasm, hücrel şizont ve çözünür şizont antijenlerinin ELISA ile *Theileria*'ya karşı oluşan antikorları belirliyebilmesine karşın parazitin farklı dönemlerinde ortak olarak görülen bazı antijenlere bağı olarak sporozoitler ile enfekte yada şizontlarla aşılınmış hayvanlarda antikor seviyelerinin arasında ayırıcı bir fark gözlenmemektedir (Manuja ve ark 2000). Ham protein ekstraktları yerine kullanılacak parazitin makroşizont dönemine özgül antijenler hem aşılınmış hemde doğal enfekte hayvanların belirlenebilmesine olanak sağlayacaktır. Tropikal theileriosis'e karşı uygulanacak aşılama programlarının oluşturulabilmesi amacıyla yapılan epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilecek yöntemlerden biri parazitin farklı yaşam dönemlerine özgül olan antijenlerin bir arada kullanılarak test edilen serum örnekleri hakkında daha kapsamlı bilgi edinilmesi



olabilir. Bu amaçla; makroşizont dönemine özgü antijenler kullanılarak hayvanların enfeksiyonu taşıyıp taşımadıkları (hem aşıli hemde doğal enfekte hayvanların belirlenmesi) belirlendikten sonra pozitif olan örneklerde parazitin sporozoit dönemine özgül antijenler kullanılarak hayvanlarda enfeksiyonun doğal yolla oluşup oluşturulmadığı ayırt edilebilir. Bir diğer yolda aşılama kullanılan atenüye parazit suşunun hayvanlarda piroplasm oluşturma yetisini tam olarak kaybedip etmediğinin belirlenmesi ve bu yolla enfeksiyonun devamının engellenebilmesi amacıyla parazitin piroplasm dönemine özgü antijenler kullanılarak aşıli hayvanlarda bu döneme özgü antikorların varlığı araştırılabilir. Parazitin farklı yaşam dönemlerine özgü antijenlerin kullanılması yapılan epidemiyolojik çalışmalarda hastalığın prevalansı hakkında kapsamlı bilgi edinilmesini sağlayıp daha etkili kontrol programlarının oluşturulmasına fayda sağlayacaktır (İlhan 1999).

Bahsedilen antijenler arasında yer alan sporozoit yüzey antijeni, SPAG-1 (Williamson ve ark 1989, Hall ve ark 1992), merozoit rhoptri antijeni, Tamr-1 ( Shiels ve ark 1994, İlhan ve ark 1998), 32 kDa merozoit/piroplasm yüzey antijeni, Tams-1 (Glascodine ve ark 1990), prolinden zengin *T. lestoquardi* benzeri protein, NC-10 (İlhan 1999), ısı şok proteini 70, HSP70 (Kachani ve ark 1992a) yüzey antijeni, TaSP (Schnittger ve ark 2002), sporozoit, makroşizont ve piroplasm dönemlerinde sentezlenen TaD proteini (Schneider ve ark 2004), makroşizont ve piroplasm dönemlerinde sentezlenerek konak hücre içerisine salgılandığı düşünülen TaSE proteini (Schneider ve ark 2007) ile mitokondriyal ısı şok proteini, TamtHSP70 (Schnittger ve ark 2000) bulunmaktadır. Özellikle, *T. annulata*'nın genom diziliminin belirlenmesi (Pain ve ark 2005) ve biyoinformatik yöntemlerin yardımı ile parazitin farklı dönemlerinde yüksek oranda sentezlenen, dizilimde belli amino asit alanlarına sahip antijenik özellikleri olan proteinlerin belirlenmesine olanak sağlamıştır. Bu proteinler arasında 23 kDa'lık piroplasm yüzey proteini, Mero1, sub-telomerik bölgede bulunan *SVSP* gen ailesi içinde belli genler arasındaki korunmuş bölgelerin sentezlediği ortak protein bölgeleri (Weir 2006) bulunmaktadır.

SPAG-1 rekombinant proteini kullanılarak yapılan indirekt ELISA testi sonucunda bu proteinin doğal şartlarda enfeksiyona yakalanan hayvanların belirlenmesinde re enekte olmamış yada tekrarlı kene enfestasyonuna maruz kalmamış hayvanlarda bu antijene karşı oluşan antikor miktarının tanı için yeterli düzeyde olmadığı görülmüştür (Matita 1994, Williamson ve ark 1994). Bu sonuçlar ışığında da rekombinant SPAG-1 proteininin enfeksiyonların erken dönemde teşhisine olanak vermesine rağmen bağışıklık sistemi ile sporozoitlere maruz kalma süresinin çok kısa olmasından dolayı antikor miktarı hızlı şekilde tespit sınırlarının altına düşmektedir. Testin kullanılabilir olması için tekrarlı sporozoit

enfeksiyonu gereklidir. Bununla birlikte bir diğ er protein olan rekombinant Tamr-1 (merozoit rhoptry antijeni) kullanılarak yapılan ELISA testi ile bu proteinin tanı için uygun olduğu belirtilmiştir (Matita 1994). Yapılan bir diğ er çalışmada bu antijen sporozoitler ile enfekte hayvanların belirleyebilmiş, ancak atenüye hücre kültür ile aşılana n hayvanlarda bu proteine karşı geliş en antikor yanıtın yeterli düzeyde olmadığı ve preimmun hayvanlardaki antikor düzeyine yakın yada çok az yüksek olarak seyrettiğ i belirtilmiştir (Ilhan 1999). Tams-1 rekombinant antijeni kullanılarak yapılan ELISA sonuçlarında, enfekte hayvanlarda üç aydan önceki dönemlerde IFA testinin daha güvenilir sonuç verdiğ i görülmüştür. Ayrıca, Tams1 antijenine karşı geliş en antikor titresi uzun süre (yaklaşık bir yıl) vücutta yüksek düzeylerde seyretmesinden dolayı enfeksiyona yeni yakalanmış hayvanların taşıyıcı durumdaki hayvanlardan ayırımını zorlaştırmaktadır. Buna ilave olarak, *T. parva*'nın bazı suşları ile çapraz reaksiyon vermektedir (Gubbels ve ark 2000). HSP70 rekombinant proteinine karşı Western blot yöntemi ile immunreaksiyon geliştiğ i bildirilmiş (Kachani ve ark 1992a), ancak ELISA ile test edilmemiştir. Bu nedenle bu proteinin serolojik amaçlı kullanılabilirliğ i tam olarak bilinmemektedir. NC10 proteinine karşı geliş en bağışık yanıtın ve bu proteinin ELISA testinde kullanılabilirliğ inin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda kullanılan deneysel enfekte hayvan serumları ile elde edilen sonuçlar bu proteinin tek başına epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilirliğ inin düşük olduğunu göstermiştir (İlhan 1999). TaD immunojenik bir protein olmasına karşın patojen olmayan ovine *Theileria* türleri ile çapraz reaksiyon vermektedir. TaSE immunojenik bir proteindir, ancak bu proteine karşı geliş en antikor titresi ve bunun tanı amacıyla kullanılmasına ilişkin sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır (Seitzer ve ark 2007). Biyoinformatik yöntemler kullanılarak belirlenen Mero1, RP2 ve RP4 proteinlerine karşı geliş en bağışık yanıt ve bunların serolojik testlerde tanı amaçlı kullanılması ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır.

Bu kısımda farklı rekombinant antijenlerin serolojik olarak ELISA yöntemi ile tropikal theileriosis'in belirlenmesindeki etkinliğ inin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda Western blotlarda (Bknz. 2.2 ve 2.3/Bulgular) antijenik özellik gösterdiğ i belirlenen ve parazite ait farklı yaş am dönemlerinde sentezlenen TaSP (sporozoit ve makroşizont), Ta9 (makroşizont), Ta9.4 (makroşizont) ve TA06510 (makroşizont) rekombinant proteinleri için ELISA testinin optimizasyonu ve standardizasyonu yapıldıktan sonra her antijen için ayrı ayrı duyarlılık ve özgüllükler belirlenmiştir. Bu amaçla deneysel olarak sporozoit ve yüksek pasajlı (pasaj 367) hücre kültürleri ile enfekte edilmiş hayvanların serumları (İlhan 1999) ile doğal enfekte hayvanlardan elde edilen serumlar kullanılmıştır.

## 2.4.1. Gereç ve Yöntem

### 2.4.1.1. Enzim İşaretli İmmunosorbant (ELISA) Testi

Deneyisel enfekte ve saha serum örneklerinde TaSP, TA06510, Ta9 ve Ta9.4 rekombinant proteinlerine karşı oluşan IgG seviyeleri indirek ELISA yöntemi kullanılarak incelenmiştir. ELISA yönteminde kullanılan antikorlar ile solüsyonlar ve testin yapılışı aşağıda anlatılmıştır.

ELISA'da konjugat olarak tavşanlarda üretilmiş, horse radish peroksidaz ile işaretli, anti-bovine IgG (Sigma; A-5295) kullanılmıştır. Stok konjugat 50 µl'lik hacimlere bölünerek -20°C'de saklanmış ve bir kez çözdürüldüklerinde +4°C'de muhafaza edilmiştir. Rekombinant proteinlerin 96 gözlü plaklara bağlanması amacıyla 0.05M karbonat-bikarbonat tampon solüsyonu, pH 9.6, (Sigma) kullanılmıştır. Solüsyon karbonat-bikarbonat'ın bir kapsülünün 100 ml deiyonize su içerisinde çözdürülmesi ile hazırlanarak +4°C'de en fazla bir hafta süreyle muhafaza edilmiştir.

ELISA'da, yıkama solüsyonu olarak içerisinde %0.05 oranında polioksiksetilen sorbitan monolaurate (Tween 20, Sigma) ihtiva eden fosfat tampon tuz solüsyonu (PBS; 144mM Sodyum klorid, 1.47mM Potasyum dihidrojen orthofosfat, 8.1mM di-Sodyum hidrojen orthofosfat dodekahidrat, 2.68 mM Potasyum klorid, pH 7.4) kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyon en fazla bir ay boyunca oda ısısında muhafaza edilerek kullanılmıştır. Bloklama solüsyonu olarak içerisinde %5 yağsız süt (Marvel) bulunan PBS/%0.05 Tween20 (PBS/T) kullanılmıştır. Testte kullanılan serum ve konjugatlar içerisinde %5 Marvel ihtiva eden PBST (içerisinde %0.05 oranında Tween 20 ihtive fosfat tampon tuz saline, pH 7.4) ile sulandırılmıştır. Solüsyon oda ısısında iki gün boyunca muhafaza edilmiştir. İkincil antikor olarak horse radish peroksidaz (HRP) ile işaretlenmiş anti-bovine IgG molekülü (Sigma) kullanılmıştır.

Oluşan antijen-antikor birleşmesinin belirlenmesi amacıyla substrat olarak 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidin dihidroklorid (TMB, Sigma) kullanılmıştır. Daha önceden hazırlanan ve içerisinde sodyum perborat bulunan 10 ml fosfat-sitrat tampon solüsyonuna (100 ml deiyonize su içerisinde bir kapsül) 1 mg substrat/tabletten bir adet konularak erimesi sağlanmıştır. Substrat solüsyonu kullanımdan hemen önce taze olarak hazırlanmıştır.

Hasta ve/veya aşıllı hayvanların teşhisinde kullanılacak rekombinant proteinlere karşı oluşan IgG'lerin belirlenmesi amacıyla yapılan ELISA testi 96 gözlü polistiren mikro ELISA plakları (Dynatech, Immulon, Type I, USA) kullanılarak yapılmıştır. Karbonat-bikarbonat solüsyonu içerisinde sulandırılarak hazırlanan antijenlerden her göze 100 µl gelecek şekilde

eklendikten sonra plak kaplayıcılar (ICN Biomedical) ile üzerleri kapatılmıştır. Daha sonra plaklar mikrolate çalkalamalı inkübatörü içerisinde, eklenen antijenlerin her gözün dip kısmında düzgün bir şekilde dağılması amacıyla, 30 saniye boyunca, oda ısısında nazikçe çalkalanmışlardır. Bu aşamadan sonra plaklar +4°C’de gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün tüm gözler çok kanallı otomatik pipetler kullanılarak her göze 300 µl PBST solüsyonu gelecek şekilde beş defa yıkanmıştır. Her yıkamadan sonra plaklar sallanarak içlerinde kalan bağlanmamış antijenlerin ve diğer bileşenlerin giderilmesi sağlanmış ve daha sonra plaklar kağıt havlular üzerine ters olarak kapatılarak içlerindeki fazlalık yıkama solüsyonlarından arındırılmıştır. Yıkama işleminden sonra her plak gözüne oluşabilecek özgül olmayan bağlanmaların önüne geçmek amacıyla 300 µl bloklama solüsyonu (PBST+%5 süt tozu) konularak 37°C’de bir saat boyunca mikrolate çalkalayıcısında inkübe edilmiştir. Bloklama işleminden sonra plaklar bir kez yıkanmış ve daha sonra plak gözlerine 100’er µl PBST+%5 Marvel içerisinde sulandırılarak hazırlanmış test edilecek serum örnekleri her plakta ikili olacak şekilde eklenmiştir. Ayrıca her plağa dörder adet konjugat kontrol (Cc), yüksek pozitif serum (C++), düşük pozitif serum (C+) ve negatif serum (C-) eklenmiştir. Daha sonra plakların üstleri kapatılarak 37°C’de iki saat boyunca mikrolate çalkalayıcısında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben plaklar tekrar PBST ile beşer kez yukarıda anlatıldığı şekilde yıkanmış ve her göze 100 µl horseradish peroksidaz ile işaretli 1:15000 oranında dilüye substrat eklenerek 37°C’de bir saat boyunca mikrolate çalkalayıcısında inkübe edilmiştir. Bunu takiben, plaklar tekrar beşer kez PBST ile yıkandıktan sonra her göze 200 µl TMB substratı eklenerek 20 dakika boyunca oda ısısında çalkalamalı inkübatörde bekletilerek renk oluşması sağlanmış ve en son enzimatik reaksiyonun durdurulması amacıyla her göze 100 µl 0.2M sülfirik asit eklenmiştir. Reaksiyon sonucunda oluşan rengin ELISA plak okuyucusunda (ELX 808, Biotech) 450 nm filtre kullanılarak absorbans değerleri (optik dansiteleri; OD) belirlenmiştir.

#### **2.4.1.2. ELISA Testinin Standardizasyonu**

ELISA testinde kullanılacak olan antijen ve antikor belirlenmesi amacıyla ilk aşamada iki katlı (Örnek; 1/20, 1/40, ....., 1/3200) hazırlanan antijen dilüsyonları sabit dilüsyondaki serum örneği konjugat ile denenerek kullanılacak olan antijenin en iyi sonuç verdiği dilüsyon belirlenmiştir. Kullanılacak olan serumun optimal dilüsyonunun belirlenmesi amacıyla aynı işlem bu kez sabit antijen dilüsyonuna karşı iki katlı dilüye edilmiş serum örnekleri kullanılarak yapılmış ve optimal serum dilüsyonu tayin edilmiştir. Yapılan tüm ELISA

testlerin de kullanılan konjugat (HRP işaretli antibovine IgG, Sigma) üretici firma tarafından önerilen oranda (1/15000) kullanılmıştır.

ELISA testinde kullanılacak olan negatif (C-), düşük pozitif (C+) ve yüksek pozitif (C++)'lik gösteren referans kontrol serum örnekleri deneysel enfekte hayvanlardan elde edilen enfeksiyon öncesi ve sonrası serumlar kullanılarak belirlenmiştir.

#### **2.4.1.3. ELISA Testinin Duyarlılık, Özgüllük ve Kesim (cut-off) Noktasının Belirlenmesi**

ELISA testinin duyarlılığı *T. annulata*'nın sekiz farklı suşuna (Ankara, Diyarbakir, Gharb, Hissar, Ode, Tova, Tunisia, Razi) ait sporozoit ya da makroşizont hücre kültürü ile Edinbrugh Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Tropikal Hastalıklar Merkezi (CTVM)' de deneysel olarak enfekte edilen hayvanlara ait enfeksiyonu takiben 28–58. günlerde alınan toplam 200 pozitif serum örneği kullanılarak belirlenmiştir. Testin özgüllüğü deneysel enfekte hayvanlardan enfeksiyon öncesi alınan toplam 180 negatif serum örneği kullanılarak belirlenmiştir.

ELISA protokolünün standardizasyonu amacıyla test edilen serum örneklerine ait optik dansite (OD) ölçümleri antikor belirlemeye yönelik ELISA testleri için geliştirilen uluslararası ilkelere göre yüzde pozitif (PP) değerine çevrilmiştir (Wright ve ark 1993). Her örnek gözüne ait OD ölçümlerine ait PP değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$PP = \frac{\text{Her göze ait OD}}{\text{Medyan OD}_{C++}} \times 100$$

Medyan OD<sub>C++</sub> değeri; üst ve alt sınırlar içerisinde yer alan en az üç yüksek pozitif kontrol (C++) OD' lerine ait ortancayı ifade etmektedir.

Optimize edilen ELISA'da her antijen için ayrı ayrı olacak şekilde, kesim (cut-off) noktaları bilinen negatif ve pozitif serum örneklerine ait PP değerlerine ait ters yönlü kümülatif frekans dağılımları yapılarak belirlenmiştir. Bu amaçla PP değerlerinin sıklık (frekans) değerleri ile kümülatif yüzdeleri belirlenmiştir. Negatif ve pozitif serumlara ait sıklık değerleri ile negatif kümülatif yüzde ve ters yönlü pozitif kümülatif yüzde dağılımları karşılaştırılarak her antijen için 0–100 arasındaki (1PP aralığında) bir kesim noktası belirlenmiştir (Greiner ve ark 1995a,b).

Testin duyarlılığı, pozitif test örneği sayısının *T. annulata* ile enfekte toplam hayvan sayısına bölünmesi ile, testin özgüllüğü ise negatif test örneği sayısının *T. annulata* ile enfekte olmamış toplam hayvan sayısına bölünmesi ile belirlenmiş ve yüzde (%) cinsinden ifade edilmiştir.

#### 2.4.1.4. İndirek Floresan Antikor (IFA) Testi

IFA testi, ELISA yönteminin geliştirilmesinde kullanılacak olan antijenlerin saha şartlarında hastalığın endemik olarak görüldüğü bölgedeki hayvanlardan toplanan serum örneklerinin değerlendirilmesinde referans test olarak kullanılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda IFAT'ta kullanılan *T. annulata* ile enfekte hücre kültürlerinden Minami ve ark. (1983) tarafından belirtilen yöntem ile hazırlanan antijenler kullanılmıştır.

Üreme vasatında (RPMI 1640+%10 NCS+Penisilin/Streptomisin) bulunan hücrelerin Thoma lamında sayımı yapıldıktan sonra mL'sinde yaklaşık olarak  $10^6$  hücre bulunan kültürler 1500 devirde 10 dakika 15 ml'lik falkon tüplerde santrifüj edilerek dipte toplanmaları sağlanmış ve bu hücrelerin üzerine 15 ml 1xPBS, pH 7.2 eklenerek tekrar sulandırılarak yukarıdaki şekilde santrifüj edilmişlerdir. Bu işlem toplam üç kez tekrarlanarak hücreler yıkanmıştır. Son yıkama işleminden sonra dipte toplanan hücreler ml'sinde  $5 \times 10^7$  hücre olacak şekilde 1xPBS ile sulandırılmış daha sonra üzerine eşit hacimde soğuk 1/10'luk formalin (%3.7 formaldehid PBS içerisinde sulandırılarak hazırlanmıştır) damla damla eklenerek karıştırılmış ve bu karışım 10 dakika boyunca buz üzerinde bekletilerek hücrelerin fikzasyonu sağlanmıştır. Fikse edilen hücreler, daha önceden elmas kalemiyle çizilerek hazırlanan temiz lamın üzerindeki yuvarlaklara, her yuvarlağa bir damla gelecek şekilde, otomatik pipetle damlatıp çekme tarzında lamın üzerine konulduktan sonra oda ısısında bir saat kurumaya bırakılmışlardır. Kurutma işleminden sonra üzerinde antijenler bulunan lamın peçetelere sarılarak içerisinde silika jel bulunan torbalar içinde kullanılıncaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmışlardır.

IFA testinde kullanılacak lamın ilk olarak  $-20^{\circ}\text{C}$ 'den alınarak  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de yarım saat daha sonra oda ısısında yarım saat bekletilerek kademeli olarak çözdürülmüştür. Sonra lamın üç kez PBS ile yıkanmıştır. Bu lamdaki fikse edilmiş hücrelerin üzerine PBS içerisinde 1:160 oranında sulandırılmış birincil antikordan (şüpheli hayvan serumu) 10 µl konularak 30 dakika boyunca nemli ortamda, oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. Bunu takiben lamın üç kez 1xPBS ile beşer dakika boyunca yıkanarak bağlanmamış antikorlar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 1:80 oranında sulandırılmış ikincil antikor karışımından (12,5 µl FITC ile işaretli anti-bovine IgG, Sigma+12,5 µl Evansblue, Sigma+970 µl PBS) her göze 10 µl gelecek

şekilde eklenerek yukarıda belirtildiği şekilde 30 dakika boyunca oda ısısında, karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitiminde lamalar 1xPBS ile beşer dakika yıkanarak bağlanmamış ikincil antikorlar uzaklaştırılmıştır. Son olarak lamaların üzerine pasteur pipeti yardımıyla birer damla kapama sıvısı (10 ml 50 mM Tris, pH 9.2 + 20 ml gliserol) konularak lamel yardımı ile üzerleri kapatılarak floresans mikroskop (Olympos BX51) altında incelenerek pozitif ve negatif olarak ayımları yapılmıştır. Mikroskop altında incelenen örneklerde görülen yoğun floresan ışımaya (+), az ışımaya ve hiç ışımaya olmamasında (-) olarak değerlendirilmiştir.

#### **2.4.1.5. Saha Serum Örnekleri**

Tropikal theileriosis'in görüldüğü Aydın, İzmir ve Manisa illerine bağlı toplam sekiz farklı ilçe ve köylerdeki hayvanlardan hastalık sezonunun sonuna yakın Eylül ayında toplanan 355 serum örneğindeki hastalığa karşı özgül antikor seviyelerinin belirlenmesinde TaSP, Ta9 ile Ta9.4 rekombinant proteinleri kullanılarak yapılan indirek ELISA'ların etkinliğinin referans test olarak yapılan IFA testi ile karşılaştırılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Farklı antijenler (TaSP, Ta9 ve Ta9.4) kullanılarak yapılan ELISA ve IFAT sonuçları istatistiksel olarak *ki* – kare testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

## 2.4.2. Bulgular

### 2.4.2.1. ELISA Testinde Kullanılan Reaktiflerin Standardizasyon ve Optimizasyonu

ELISA testinin geliştirilmesinde kullanılan TaSP, TA06510, Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenlerin, referans sığır serumu titrasyonları ve konjugat dilüsyonu Şekil 2.C.1 de gösterilmiştir. Tüm testlerde konjugat (HRP işaretli antibovine IgG, Sigma) üretici firma tarafından önerilen oranda (1/15000) kullanılmıştır. Kullanılan antijenler ve serum örneklerine ait optimal dilüsyon miktarları Çizelge 2.C.1’de verilmiştir.

**Çizelge 2.C.1.** Standardize edilmiş ELISA’larda kullanılan optimal antijen ve serum dilüsyonları.

	TaSP	TA06510	Ta9	Ta9.4
Rekombinant Ag	1/320	1/80	1/80	1/160
Serum	1/160	1/160	1/120	1/320
Konjugat (HRPO)*		1/15000		

(\*); konjugat (HRPO işaretli antibovine IgG, Sigma) üretici firma tarafından önerilen oranda kullanılmıştır.

Western blotlama sonuçlarına göre (Bknz. 2.2 ve 2.3/Bulgular) TaSP, Ta9, TA06510 ve Ta9.4 rekombinant proteinleri ile en iyi reaksiyon veren serum örnekleri seçilerek ELISA’ da pozitif serum örneği olarak kullanılmıştır. Ta9, Ta9.4 ve TA06510 rekombinant antijenleri kullanılarak yapılan ELISA testlerinde aynı referans serum (48C) kullanılırken, TaSP ELISA’da farklı bir referans kontrol serum örneği (21A) kullanılmıştır. Artan serum dilüsyonlarında Ta9.4 ELISA ile karşılaştırıldığında Ta9 ve özellikle TA06510 ELISA’larında ki OD okumaları daha hızlı bir şekilde düşmüştür. TaSP ELISA’da her ne kadar farklı bir serum kullanılmış olsa da serum dilüsyonlarında elde edilen OD okumaları Ta9.4 ELISA’ya benzer bir seyir göstermiştir (Şekil 2.C.1. A–D). Bununla birlikte TA06510 rekombinant antijeni kullanılarak yapılan ELISA’da elde edilen OD değerleri diğer antijenlere nazaran (TaSP, Ta9 ve Ta9.4) oldukça düşük çıkmıştır (Şekil 2.C.1, B1 ve B2).

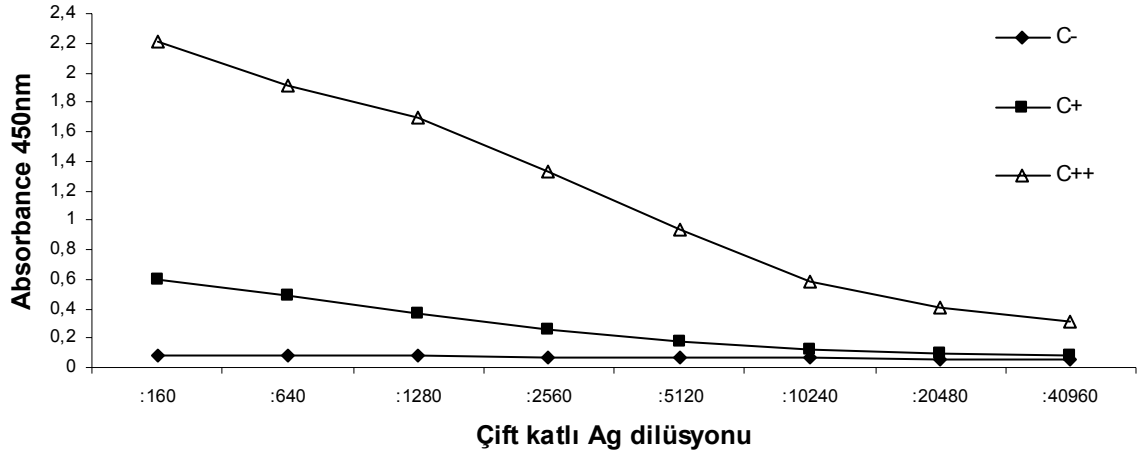
Ta9.4 ELISA Ta9 rekombinant antieni kullanılarak yapılan ELISA ile karşılaştırıldığında negatif serumla daha yoğun bir arka plan oluşturmuştur. Bununla birlikte zaman kısıtlamasından dolayı oluşan arka plan bağlanmalarının azaltılması amacıyla



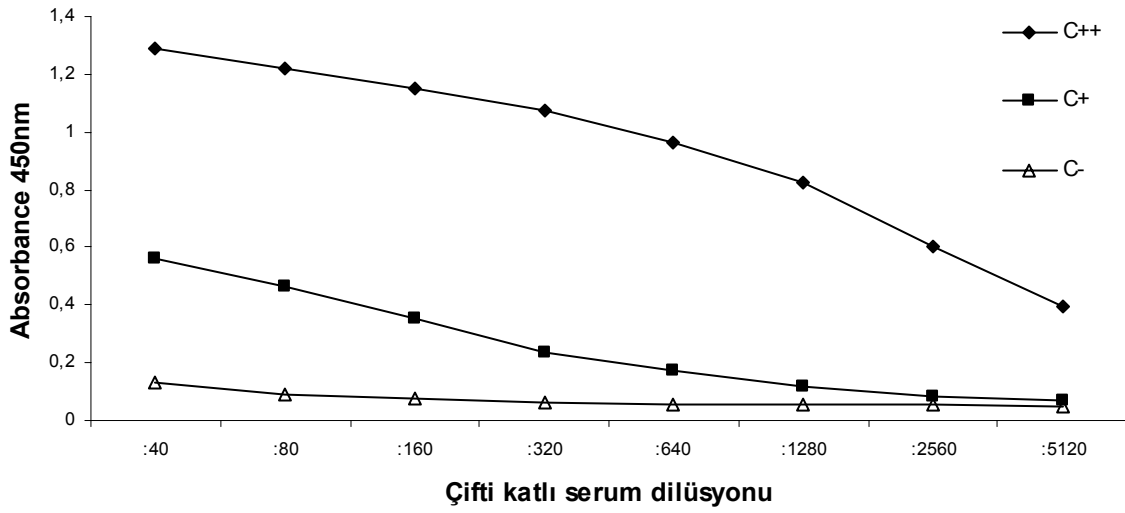
bloklama solüsyonunda kullanılan yağsız süt ve Tween 20 gibi özgül olmayan bağlanmaları önleyen maddelerin farklı dilüsyonları denenmemiştir.

Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenleri ile yapılan ELISA'da sırasıyla 1/120 ve 1/320 dilüsyonlarda kullanılan yüksek pozitif kontrol serum örnekleri (C++) oldukça yüksek OD değerleri vermiştir. TaSP ELISA'da 1/160 dilüsyonda kullanılan yüksek pozitif kontrol serum örneğinde de (C++) yüksek OD değerleri elde edilmiştir.

(A1)

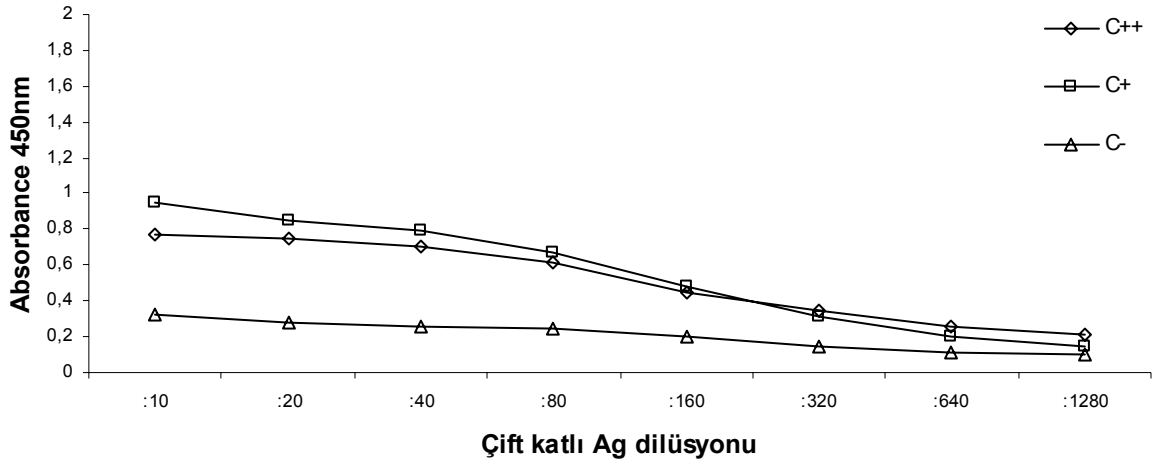


(A2)

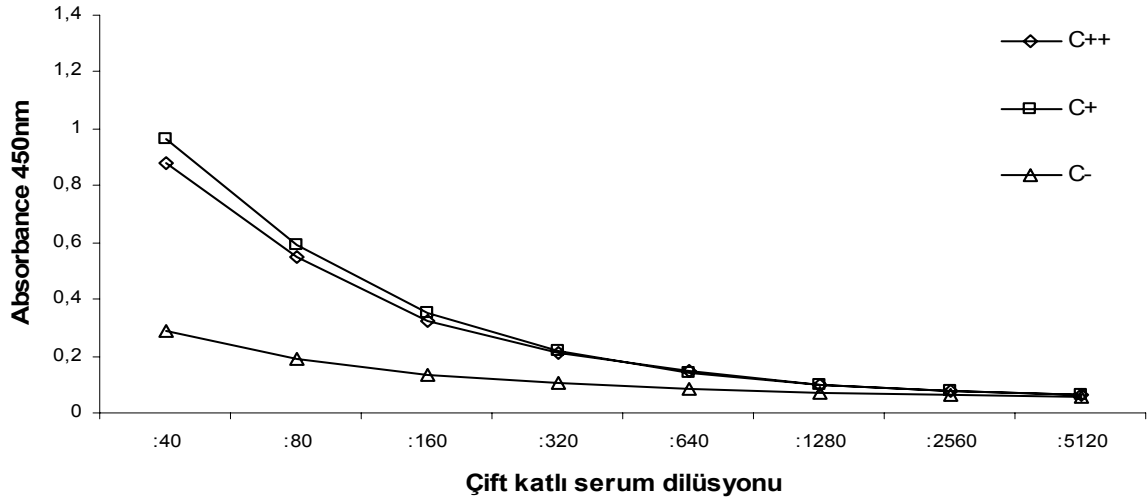


Şekil 2.C.1. Farklı rekombinant proteinlerle yapılan ELISA'nın standardizasyonunda kullanılan antijen ve kontrol serum titrasyonları. Yapılan tüm testlerde konjugat dilüsyonu 1/15000 oranında kullanılmıştır (*Devam*),

(B1)

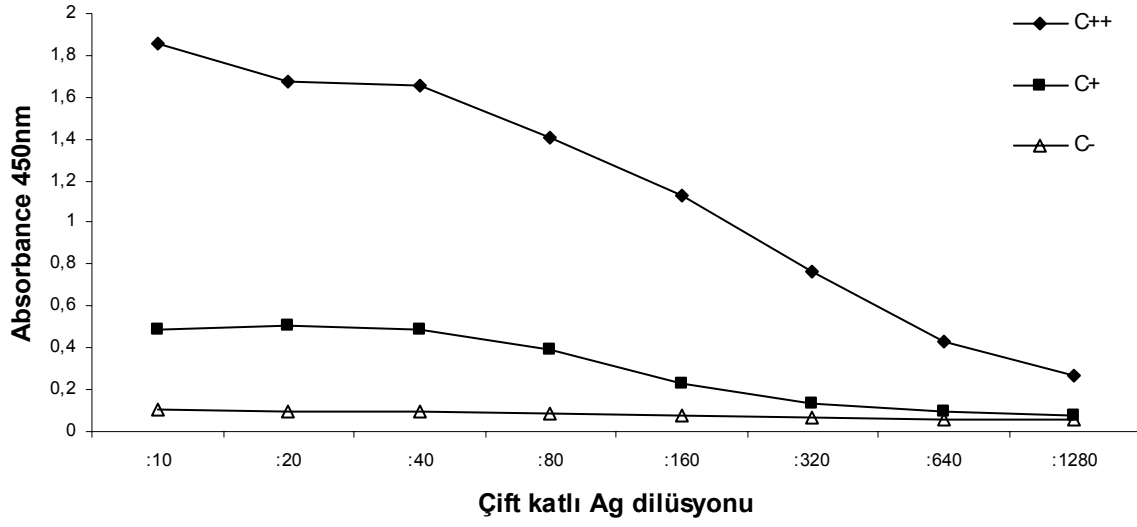


(B2)

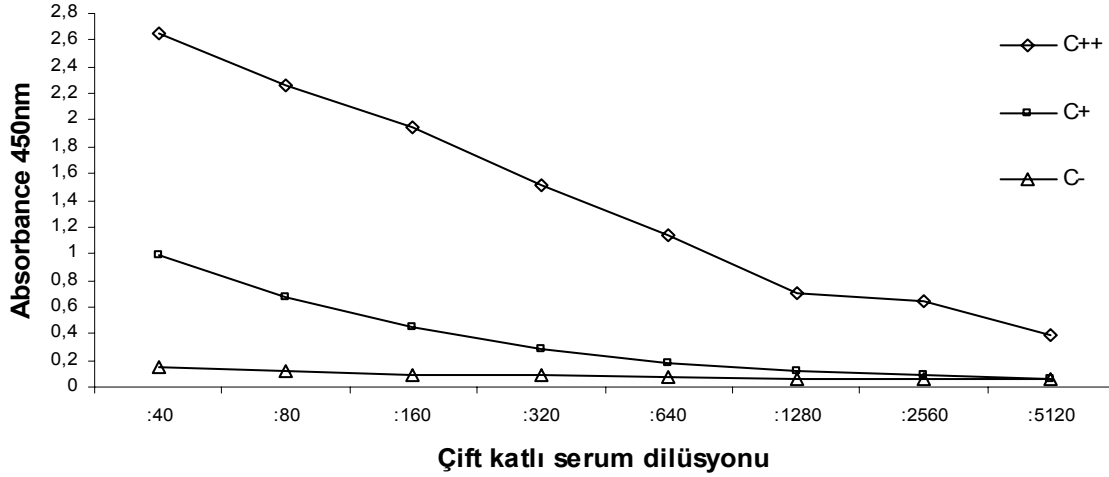


Şekil 2.C.1. Farklı rekombinant proteinlerle yapılan ELISA'nın standardizasyonunda kullanılan antijen ve kontrol serum titrasyonları. Yapılan tüm testlerde konjugat dilüsyonu 1/15000 oranında kullanılmıştır (*Devam*),

(C1)

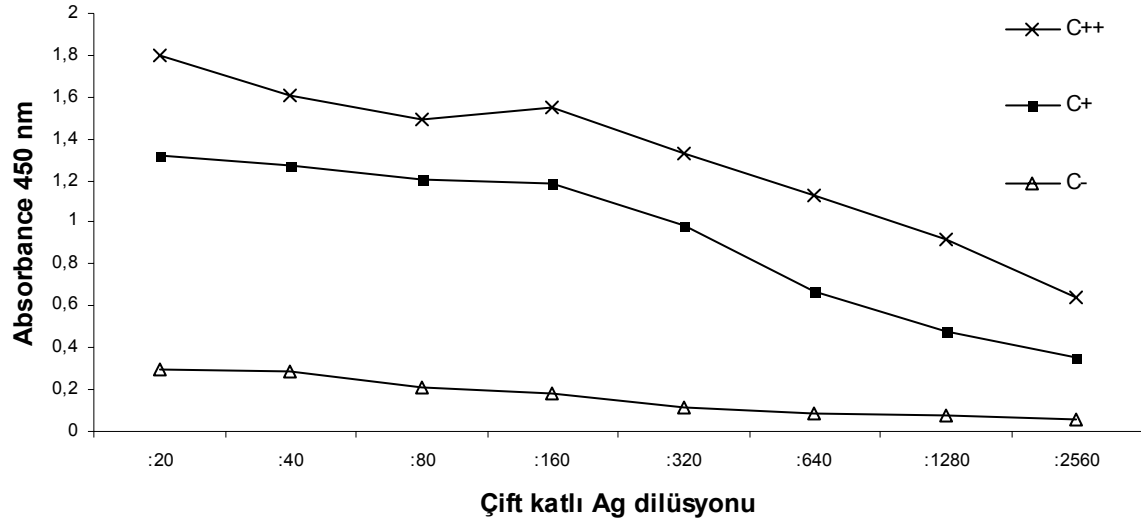


(C2)

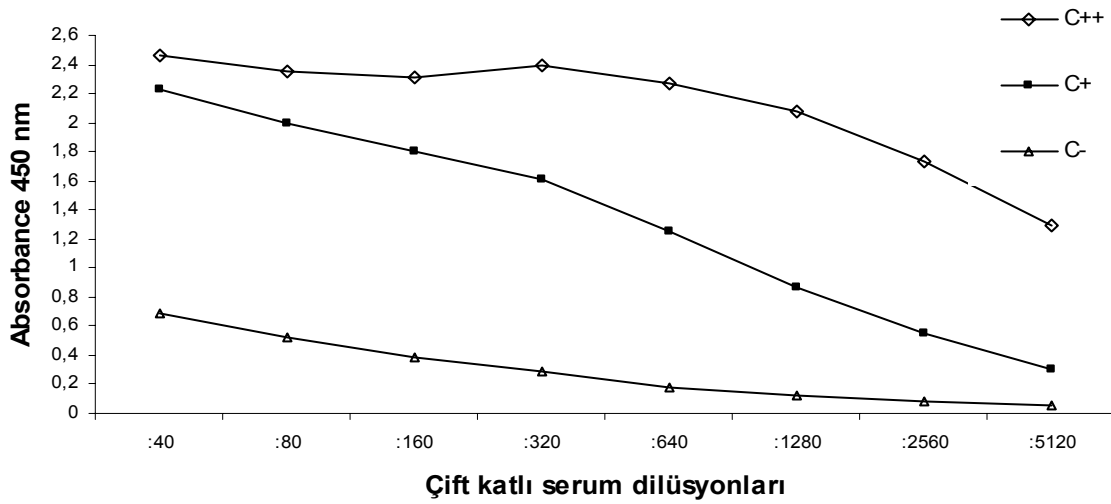


Şekil 2.C.1. Farklı rekombinant proteinlerle yapılan ELISA'nın standardizasyonunda kullanılan antijen ve kontrol serum titrasyonları. Yapılan tüm testlerde konjugat dilüsyonu 1/15000 oranında kullanılmıştır (*Devam*),

(D1)



(D2)



Şekil 2.C.1. Farklı rekombinant proteinlerle yapılan ELISA'nın standardizasyonunda kullanılan antijen ve kontrol serum titrasyonları. Yapılan tüm testlerde konjugat dilüsyonu 1/15000 oranında kullanılmıştır (*Devam*),

**Şekil 2.C.1.** Farklı rekombinant proteinlerle yapılan ELISA'nın standardizasyonunda kullanılan antijen ve kontrol serum titrasyonları. Yapılan tüm testlerde konjugat dilüsyonu 1/15000 oranında kullanılmıştır.

**(A1);** 1/200 serum dilüsyonunda TaSP rekombinat antijeninin iki katlı sulandırmaları ( :160–1:40960).

**(A2);** 1/320 dilüsyondaki TaSP rekombinant antijeni kullanılarak yapılan çift katlı (1:40–1:5120) serum dilüsyonları.

**(B1);** 1/100 serum dilüsyonunda TA06510 rekombinat antijeninin iki katlı sulandırmaları (1:10–1:1280).

**(B2);** 1/160 dilüsyondaki TA06510 rekombinant antijeni kullanılarak yapılan çift katlı (1:40–1:5120) serum dilüsyonları.

**(C1);** 1/200 serum dilüsyonunda Ta9 rekombinat antijeninin iki katlı sulandırmaları (1:10–1:1280).

**(C2);** 1/160 dilüsyondaki Ta9 rekombinant antijeni kullanılarak yapılan çift katlı (1:20–1:2560) serum dilüsyonları.

**(D1);** 1/200 serum dilüsyonunda Ta9.4 rekombinat antijeninin iki katlı sulandırmaları (1:10–1:1280).

**(D2);** 1/160 dilüsyondaki Ta9.4 rekombinant antijeni kullanılarak yapılan çift katlı (1:40–1:5120) serum dilüsyonları.

TaSP, TA06510, Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenlere karşı sporozoitler ya da yüksek pasajlı hücre kültürleri ile deneysel enfekte hayvan serumlarındaki (İlhan 1999) IgG seviyeleri OD okumaları baz alınarak ELISA ile değerlendirilmesinde elde edilen sonuçlar Şekil 2.C.2'de verilmiştir.

TA06510 ELISA'da sporozoitler ile enfekte hayvanlardaki IgG seviyeleri sadece 48C nolu hayvanda primer enfeksiyonu takip eden 56. günde enfeksiyon öncesindeki OD değerinin yaklaşık iki katına çıkmıştır, bunun haricindeki hayvanlardaki IgG seviyeleri genelde oldukça düşük seyretmiştir. Re enfeksiyon sonrasındaki dönemde ise sadece 21A nolu hayvanda antikor yanıt 48C 56. gün seviyelerine çıkmış, ancak diğer hayvanlarda primer enfeksiyon dönemine benzer olarak re enfeksiyon sonrasındaki dönemde antikor seviyeleri düşük seyretmiştir (Şekil 2.C.2. A). ELISA'da TA06510 rekombinant antijenine karşı düşük IgG yanıt oluşmasından dolayı bu protein ileriki aşamalarda kullanılmamıştır.

TaSP ELISA'da sporozoit ile enfekte hayvanlara ait enfeksiyon öncesi serum örneklerinden sadece 897A nolu hayvan da diğerlerine göre biraz daha yüksek bir OD değeri belirlenmiş, diğer hayvanlarda enfeksiyon öncesindeki dönemde OD değeri düşük çıkmıştır. Primer enfeksiyon esnasında en yüksek antikor yanıt 48C (28. gün) ve 21A (85. gün) nolu hayvanların serum örneklerinde tespit edilmiştir. 48C'deki antikor yanıt 90. güne kadar aynı seviyelerde kalmış, ancak 21A'da antikor yanıt 85. günden sonra re enfeksiyon sonrası yedinci güne (enfeksiyon sonrası 220. gün) kadar azalmıştır. Ancak 90. günden itibaren azalmaya başlayan IgG seviyesi 213. günde (re enfeksiyonun yapıldığı gün) en düşük seviyeye inmiştir. Bu dönemde dahi OD değeri enfeksiyon öncesine göre üç kat daha fazla olmuştur. Primer enfeksiyon esnasında en düşük antikor yanıt 23B nolu hayvanda görülmüş ve OD değeri ancak enfeksiyon öncesinin değerinin iki katına ancak 85. günde yükselmiştir. Primer enfeksiyon esnasında en erken antikor yanıt 897A nolu hayvanda 14. günde görülmüş ve bu dönemdeki OD değeri enfeksiyon öncesi döneme göre üç kat artmıştır. Re enfeksiyon (213.üncü gün) sonrası dönemde antikor yanıt tüm hayvanlarda tekrar yükselmiştir. En yüksek antikor seviyesi ise 21A nolu hayvanda görülmüş, diğer hayvanlarda ise antikor seviyeleri benzer düzeylerde seyretmiştir (Şekil 2.C.2, A). TaSP ELISA'da yüksek pasajlı hücre kültürleri ile enfekte hayvanlara ait enfeksiyon öncesi serum örneklerinde 32A en yüksek OD değerini vermiştir. Aşılama sonrasındaki 21. günde 308A nolu hayvanda en erken antikor yanıt oluşmuş ve daha sonraki günlerde bu hayvandaki antikor seviyesi yükselme eğilimi göstermiştir. 308 nolu hayvanı, 35. günle 528 ve 26A nolu hayvanlar takip etmiştir. Aşılama sonrasında en yüksek antikor yanıt 56.ıncı günde 32A nolu hayvanda görülmüştür. Re enfeksiyon sonrasındaki dönemde en yüksek antikor yanıt 532 nolu hayvanda gözlenmiş ve

bunu 32A, 303A, 308A ve 26A nolu hayvanlar takip etmiştir (Şekil 2.C.2, B). 54C, 891A ve 528 nolu hayvanların re enfeksiyon sonrası serum örnekleri bulunmadığı için değerlendirme yapılamamıştır.

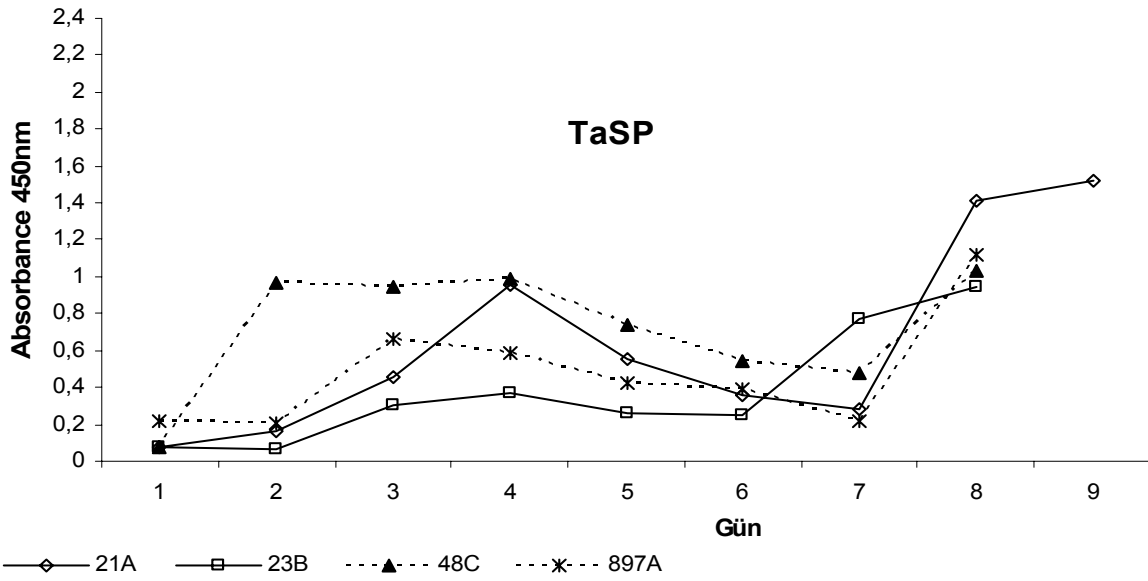
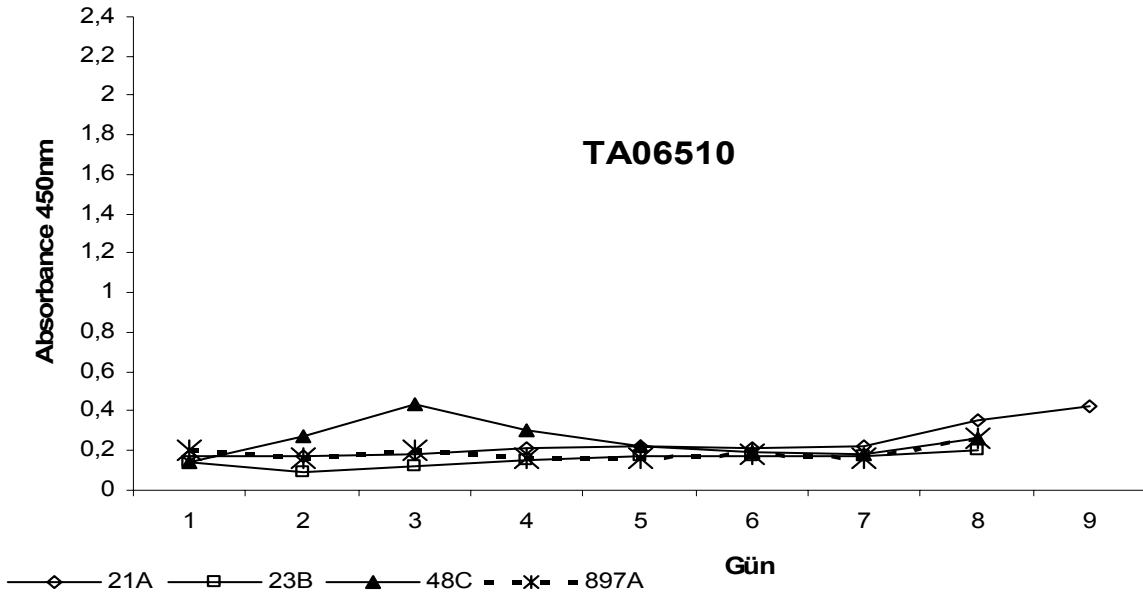
Ta9 ELISA'da, TASP ELISA'ya benzer şekilde sporozoit ile enfekte hayvanlara ait enfeksiyon öncesi serum örneklerinden sadece 897A nolu hayvan da diğerlerine nazaran biraz daha yüksek bir OD değeri belirlenmiş, diğer hayvanlarda enfeksiyon öncesindeki dönemde OD değeri düşük çıkmıştır. Primer enfeksiyon esnasında en yüksek antikor yanıt 90. günde 48C nolu hayvanda gözlenmiş ve bu hayvandaki antikor seviyesi primer enfeksiyon esnasında yüksek seyretmiştir. 48C haricindeki diğer hayvanlardaki antikor seviyeleri ise enfeksiyon öncesi dönemdeki OD değerlerine yakın seyretmiştir. Re enfeksiyon sonrasında ise 21A nolu hayvan haricinde diğer tüm hayvanlardaki IgG seviyeleri yükselmiştir, 21A nolu hayvanda ise re enfeksiyon sonrasındaki OD değerleri enfeksiyon öncesi ve primer enfeksiyon esnasındaki seviyelerinde kalmıştır (Şekil 2.C.2, A). Ta9 ELISA'da yüksek pasajı hücre kültürleri ile enfekte hayvanlara ait enfeksiyon öncesi serum örneklerinde 32A en yüksek OD değerini vermiştir. Aşılama sonrasındaki dönemdeki OD değerleri enfeksiyon öncesine benzer seyretmiştir. Ancak aşıllı hayvanlarda oluşturulan re enfeksiyon sonrasında en yüksek antikor yanıt 26A nolu hayvanda oluşmuştur. Bunun yanında 532 ve 308A nolu hayvanlardaki OD değerleri re enfeksiyon sonrasındaki dönemde primer enfeksiyon esnasındaki değerlerine göre iki kat artış göstermiştir. 32A nolu hayvanda ise re enfeksiyon sonrası çok az bir artış gözlenirken, 303A'da her hangi bir artış olmamıştır (Şekil 2.C.2, B). 54C, 891A ve 528 nolu hayvanların re enfeksiyon sonrası serum örnekleri bulunmadığı için değerlendirme yapılamamıştır.

Ta9.4 rekombinant antijeni kullanılarak yapılan ELISA'da, sporozoit ile enfekte hayvanlara ait enfeksiyon öncesi tüm serum örneklerinde OD değeri düşük çıkmıştır. Primer enfeksiyon sonrasındaki 14. günde 897A nolu hayvandaki OD değeri enfeksiyon öncesine göre en az iki kat yükselmiş, ancak 897A'daki OD değerleri bu günden sonra tekrar azalarak enfeksiyon öncesi değerlerine geri dönmüştür. Primer enfeksiyon esnasında en yüksek antikor yanıt 90. günde 48C nolu hayvanda gözlenmiş ve bu hayvandaki antikor seviyesi primer enfeksiyon esnasında genelde aynı seviyelerde seyretmiştir. Ta9.4 ELISA'da 48C nolu hayvanda gözlenen antikor seviyeleri Ta9 ELISA seviyelerine nazaran daha yüksek çıkmıştır. 48C haricindeki diğer hayvanlardaki (897A yedinci gün hariç) antikor seviyeleri enfeksiyon öncesi dönemdeki OD değerlerine yakın seyretmiştir. Re enfeksiyon sonrasında ise tüm hayvanlardaki IgG seviyeleri yükselmiş ve sırasıyla en yüksek antikor düzeyleri 48C, 21A, 897A ve 23B nolu hayvanlarda görülmüştür (Şekil 2.C.2, A). Ta9.4 ELISA'da yüksek pasajı

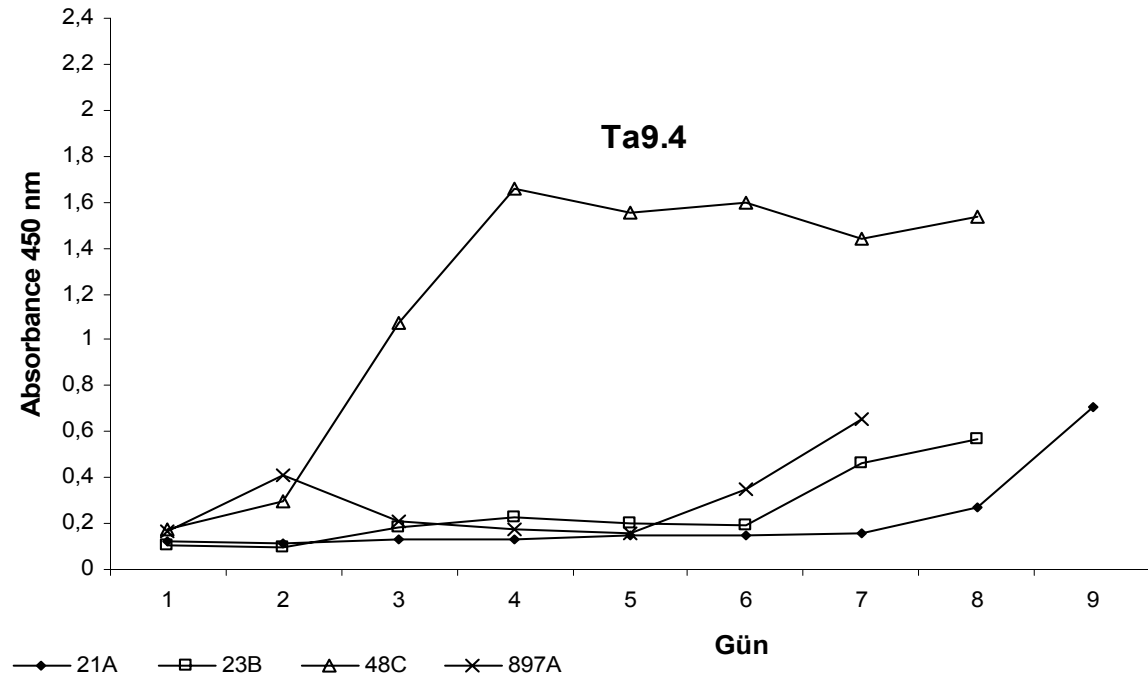
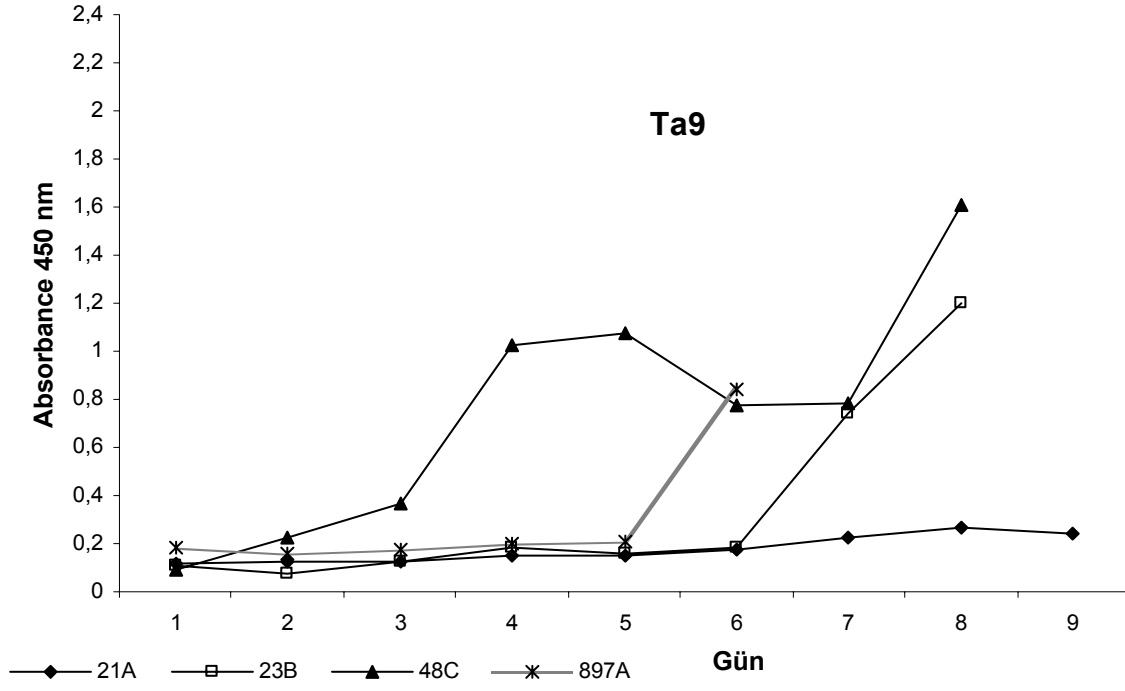


hücre kültürleri ile enfekte hayvanlara ait enfeksiyon öncesi serum örneklerinde sırasıyla 528, 32A ve 54C nolu hayvanlar en yüksek OD değerini vermiştir. OD değerleri özellikle 528 ve TaSP ELISA'ya benzer şekilde 32A'da oldukça yüksek çıkmıştır. Aşılama sonrasındaki dönemde sadece 26A nolu hayvanda OD değeri enfeksiyon öncesine göre yaklaşık dört kat artmıştır. Aşılı hayvanlarda oluşturulan re enfeksiyon sonrasında en yüksek antikor yanıt Ta9 ELISA'ya benzer şekilde 26A nolu hayvanda olmuştur. Bunu 532, 32A, 308A ve 303A nolu hayvanlar takip etmiştir (Şekil 2.C.2, B). 54C, 891A ve 528 nolu hayvanların re enfeksiyon sonrası serum örnekleri bulunmadığı için değerlendirme yapılamamıştır.

(A) *Theileria annulata* Ankara sporozoitleri ile enfekte edilen hayvanlar

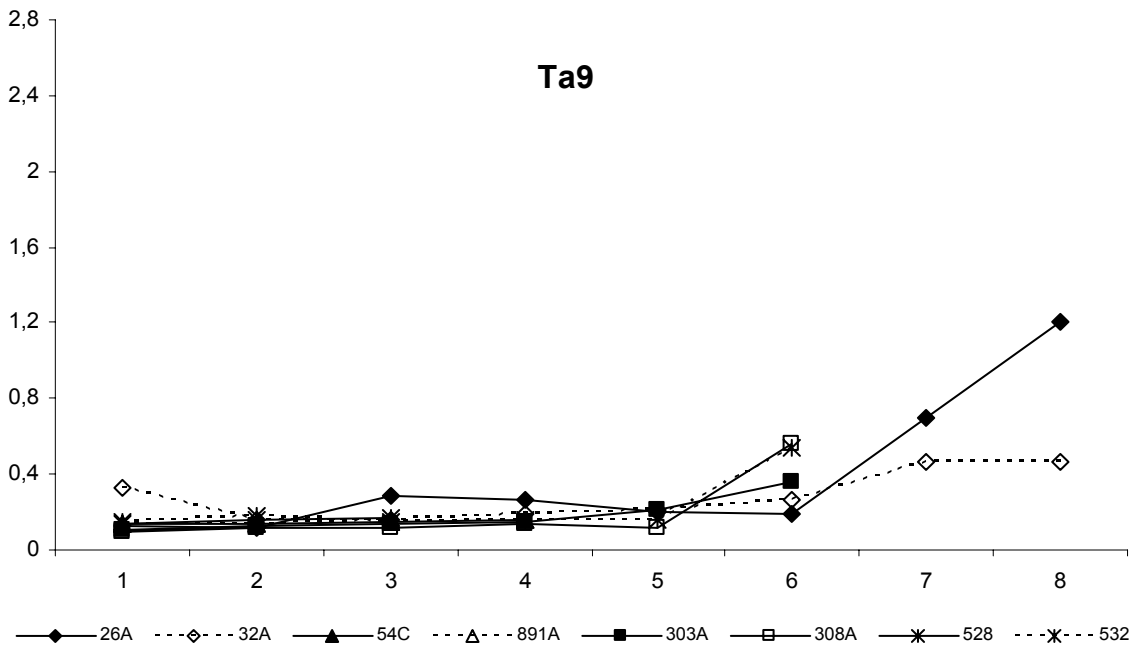
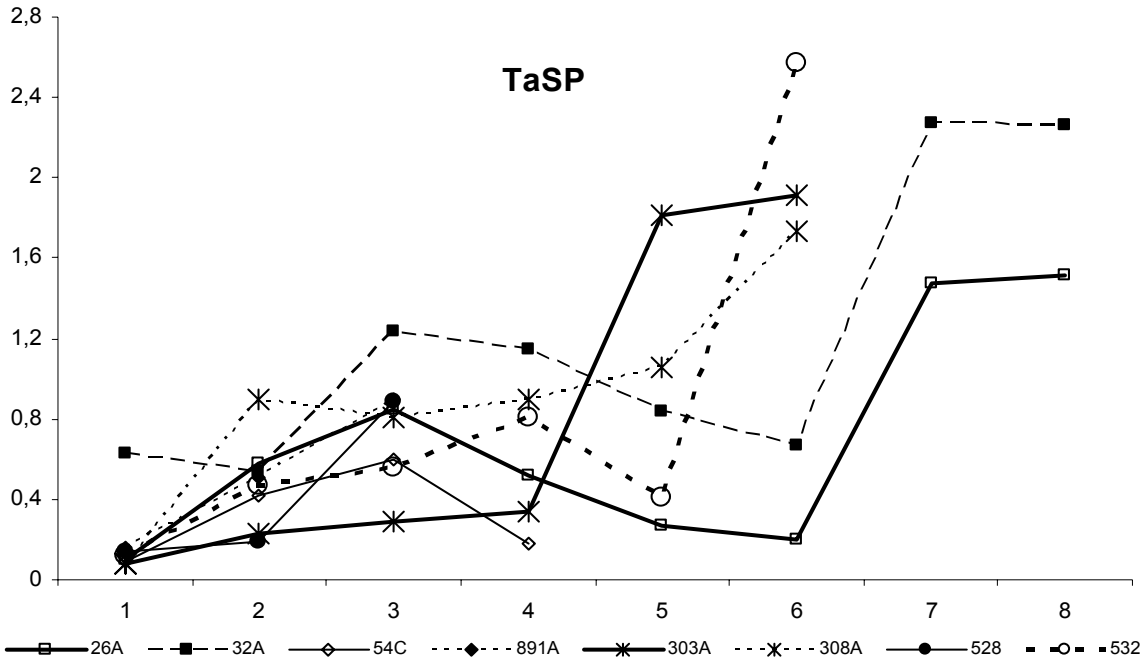


Şekil 2.C.2. Sporozoit yada yüksek pasajlı hücre kültürü ile deneysel enfekte hayvanlar ait serum örneklerinde optimize edilmiş antijen ve serum dilüsyonlarında TA06510, TaSP, Ta9 ve Ta9.4 ELISA'larıyla belirlenen IgG seviyelerine ait OD değerleri (Devam),

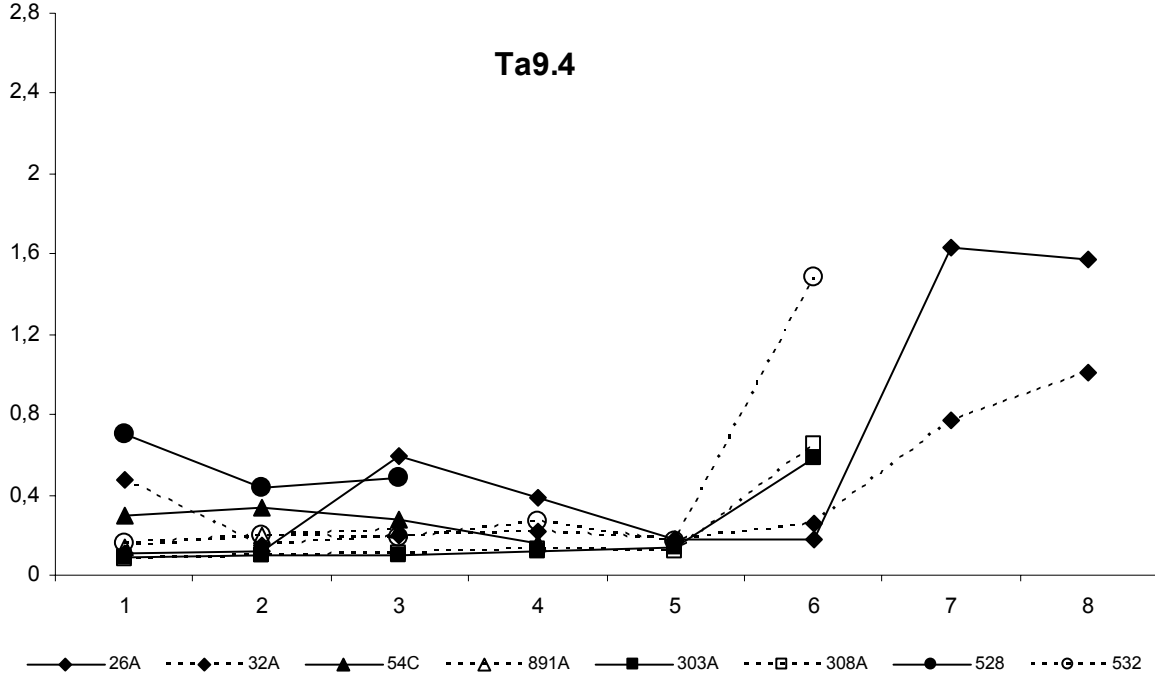


**Şekil 2.C.2.** Sporozoit yada yüksek pasajlı hücre kültürü ile deneysel enfekte hayvanlara ait serum örneklerinde optimize edilmiş antijen ve serum dilüsyonlarında TA06510, TaSP, Ta9 ve Ta9.4 ELISA'larıyla belirlenen IgG seviyelerine ait OD değerleri (*Devam*),

(B) *Theileria annulata* Ankara/Pendik yüksek pasajlı hücre kültürleri inokule edilen hayvanlar



Şekil 2.C.2. Sporozoit yada yüksek pasajlı hücre kültürü ile deneysel enfekte hayvanlar ait serum örneklerinde optimize edilmiş antijen ve serum dilüsyonlarında TA06510, TaSP, Ta9 ve Ta9.4 ELISA'larıyla belirlenen IgG seviyelerine ait OD değerleri (Devam),



**Şekil 2.C.2.** Sporozoit yada yüksek pasajlı hücre kültürü ile deneysel enfekte hayvanlar ait serum örneklerinde optimize edilmiş antijen ve serum dilüsyonlarında TA06510, TaSP, Ta9 ve Ta9.4 ELISA'larıyla belirlenen IgG seviyelerine ait OD değerleri. Yapılan tüm testlerde konjugat dilüsyonu 1/15000 oranında kullanılmıştır. Deneysel enfekte hayvanlar *T. annulata* Gharb suşuna ait sporozoit stabilatları ile re enfekte edilmişlerdir.

**(A);** *T. annulata* Ankara sporozoitleri ile enfekte edilen ve yedi ay sonra re enfeksiyona tabi tutulan hayvanlara ait serum örnekleri.

**(B);** *T. annulata* Ankara/Pendik hücre kültürlerine ait yüksek pasajlarla inokule edilen, yedi ay yada 35 gün sonra re enfeksiyona tabi tutulan hayvanlara ait serum örnekleri.

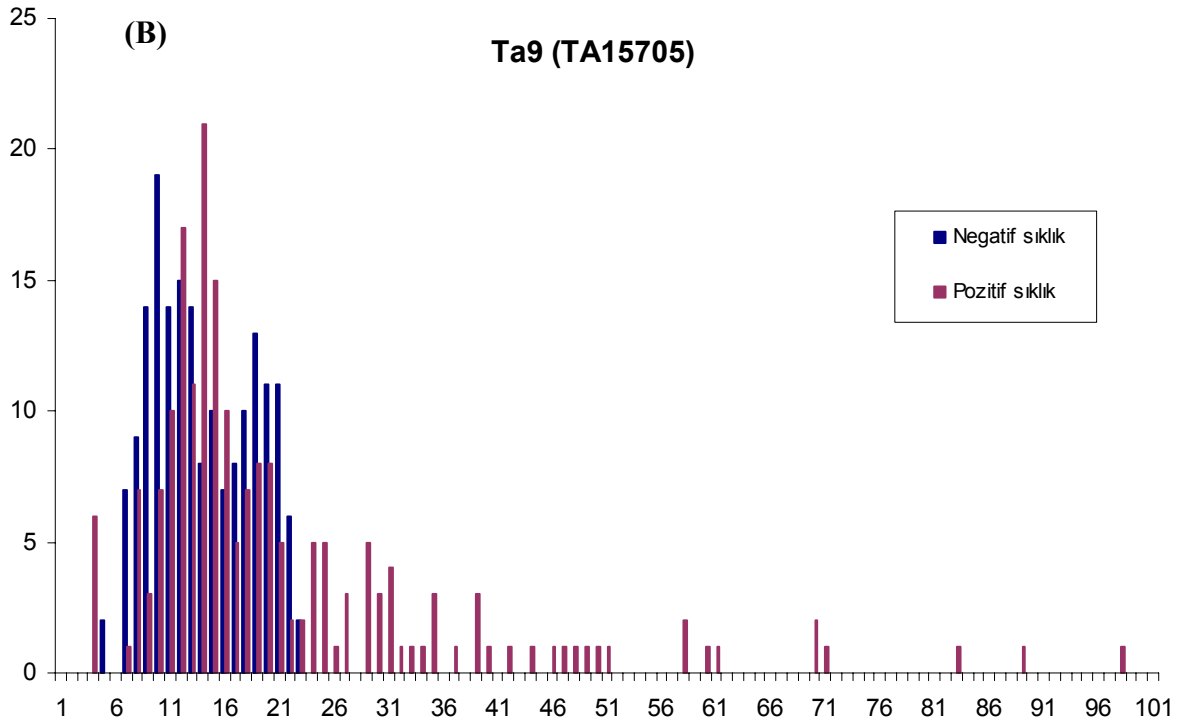
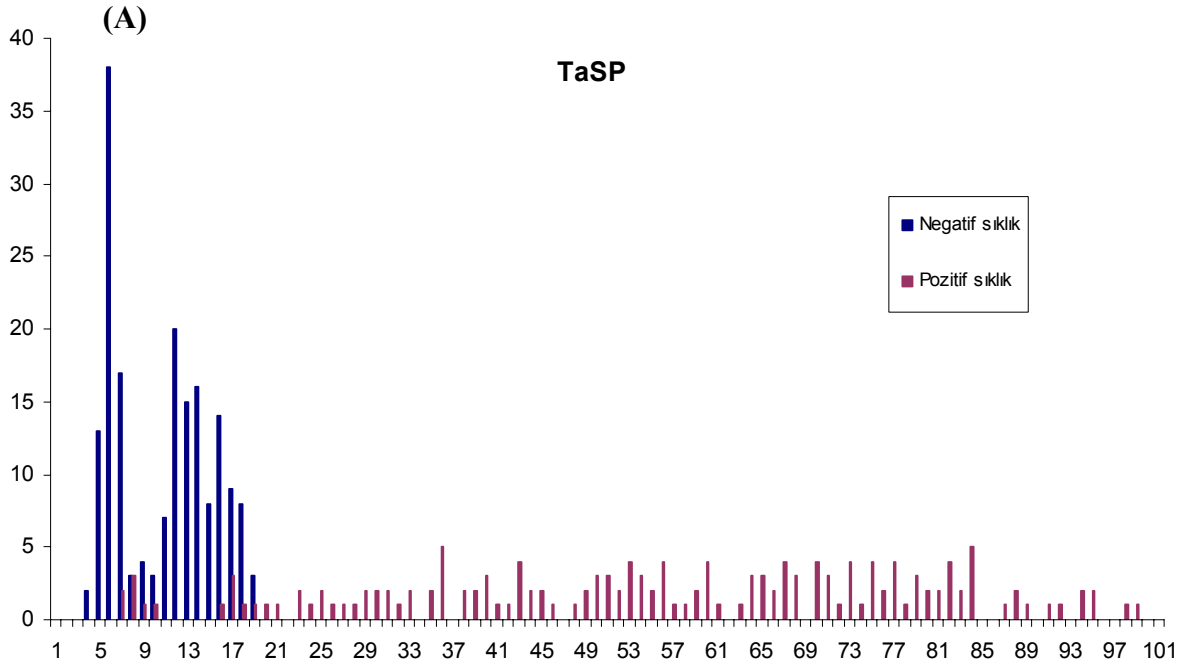
### 2.4.2.2. TaSP, Ta9 ve Ta9.4 Antijenlerinin Duyarlılık ve Özgüllükleri

TaSP, Ta9 ve Ta9.4 ELISA'lar da *T. annulata* ile enfekte (pozitif, n=200) ve enfekte olmayan (negatif, n=180) serumlara ait PP değerlerinin sıklık dağılımları sırasıyla Şekil 2.C.3. A, B ve C'de verilmiştir. Şekil 2.C.4 TG–ROC analiz sonuçlarında ELISA'larda kullanılan TaSP, Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenlerine ait cut–off değeri, duyarlılıkları ve özgüllükleri arasındaki ilişki gösterilmiştir. Her örneğe ait iki tekrarlı PP değerlerinin ortalamaları her test için  $\geq$  %95 özgüllük temel alınarak pozitif ve negatif olarak düzenlenmiştir (Çizelge 2.C.2). TaSP ELISA için belirlenen 18 PP cut–off noktasında testin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %89.5 ve %98.3 olarak belirlenmiştir. Bunun altındaki cut–off noktaları testin özgüllüğünü oldukça azaltmıştır (Şekil 2.C.4, A).

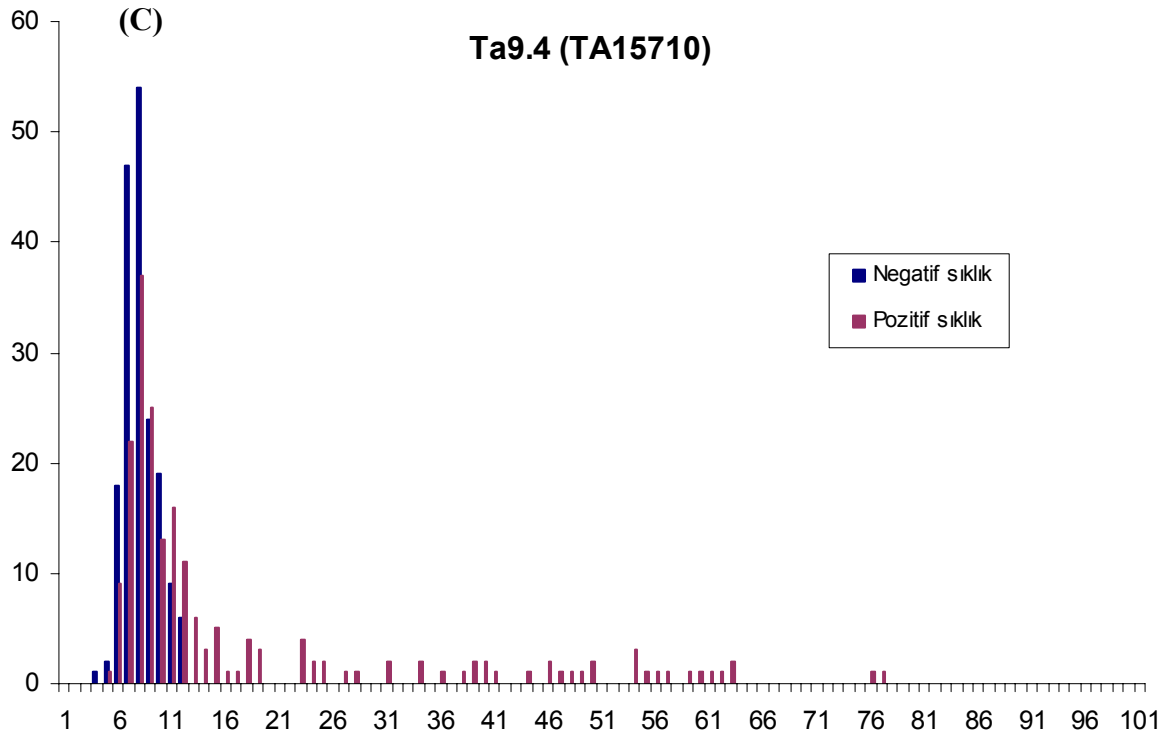
**Çizelge 2.C.2.** *Theileria annulata* sporozoitleri veya makroşizont hücre kültürleri ile enfekte hayvanlarda TaSP, Ta9 ve Ta9.4 ELISA testlerinin belirlenen yüzde (%) duyarlılıkları

Cut-off	Sporozoit (n=53)	Makroşizont hücre kültürü (n=147)	Toplam (n=200)
TaSP ELISA 18 PP	84.9	91.1	89.5
Ta9 ELISA 21 PP	13.2	34	28.5
Ta9.4 ELISA 11 PP	30.1	36.7	35

Ta9 rekombinant antijeni kullanılarak yapılan ELISA için belirlenen 21PP cut–off noktasında testin özgüllüğü %95.6 olurken, duyarlılık %28.5 gibi oldukça düşük bir değer almıştır. Ta9.4 ELISA için belirlenen 11PP cut–off noktasında testin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %35 ve %97 olarak belirlenmiştir. Ta9 ve Ta9.4 ELISA testlerinde duyarlılığın arttırması amacıyla daha düşük bir PP değerinin seçilmesi testin özgüllüğünü azalttığı için daha düşük bir cut–off noktası seçilmemiştir (Şekil 2.C.4, B ve C).

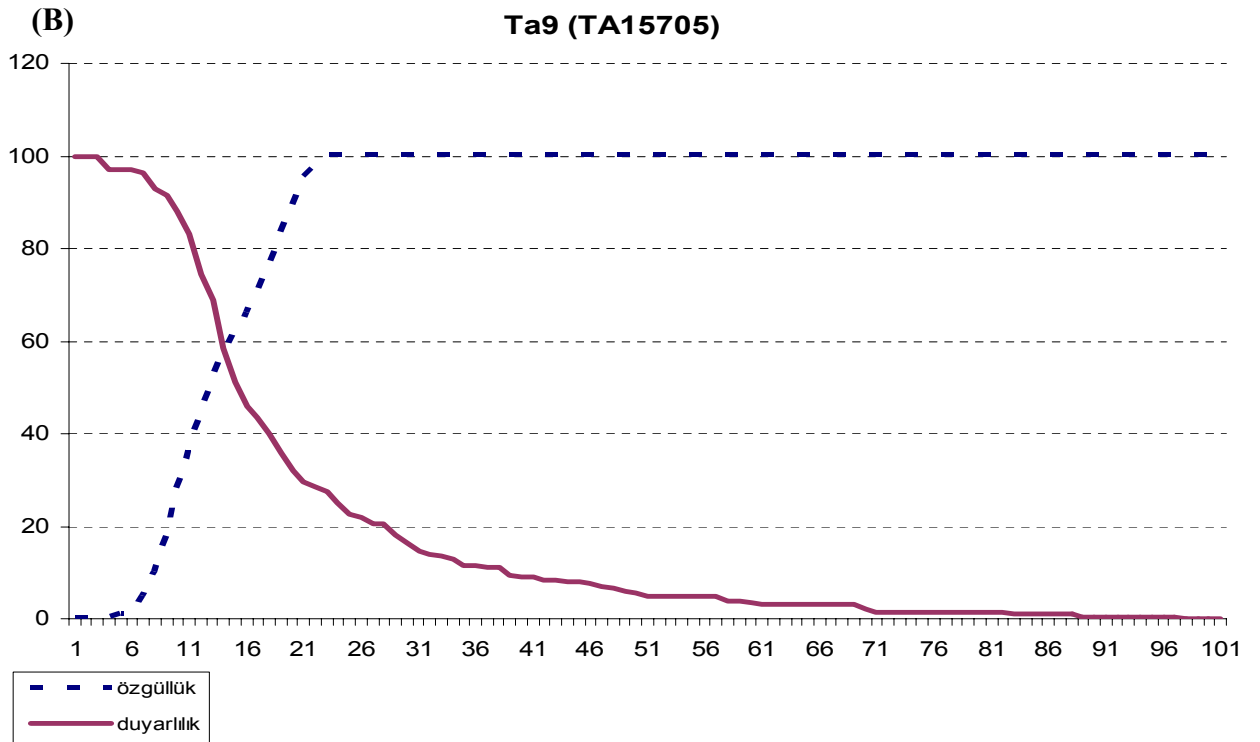
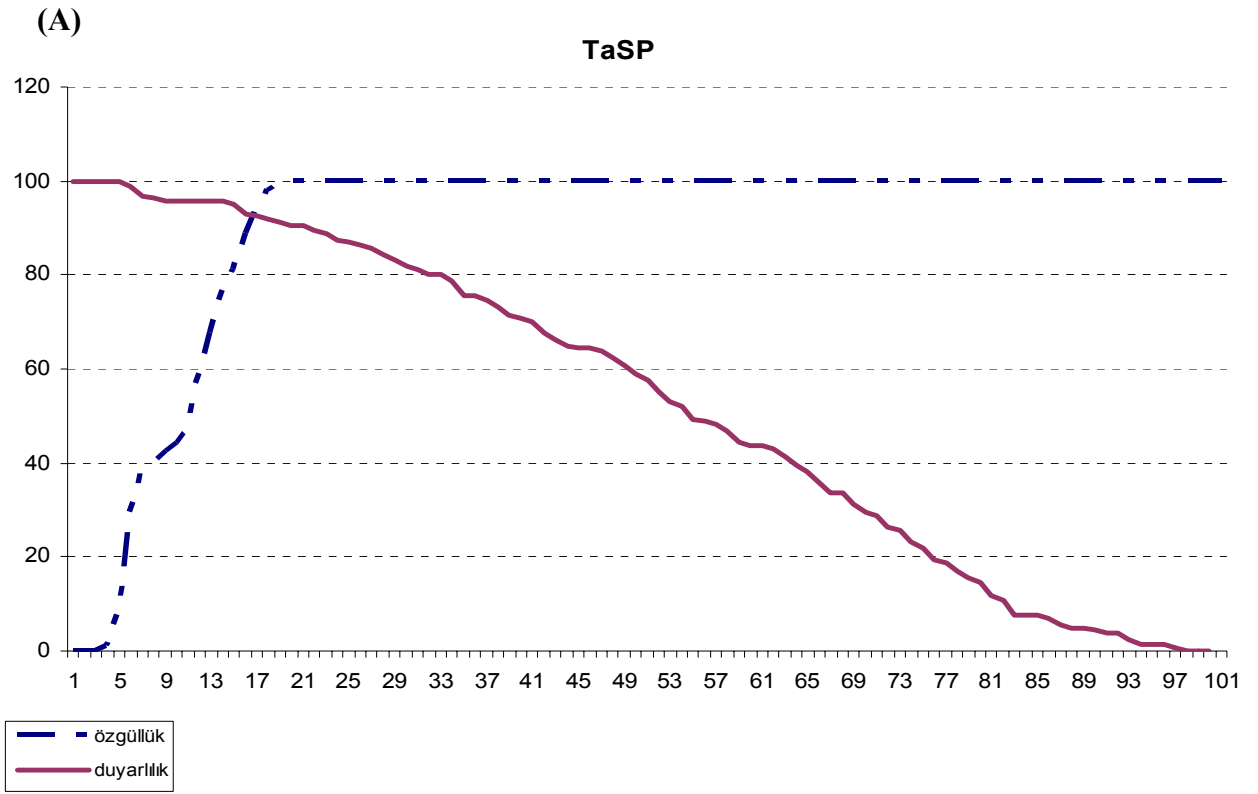


Şekil 2.C.3. TaSP (A), Ta9 (B) ve Ta9.4 (C) ELISA'nın *T. annulata* ile enfekte (pozitif, n= 200) ve enfekte olmayan (negatif, n=180) sığır serumlarına ait yüzde pozitif (PP) verilerinin sıklık dağılımları (Devam),

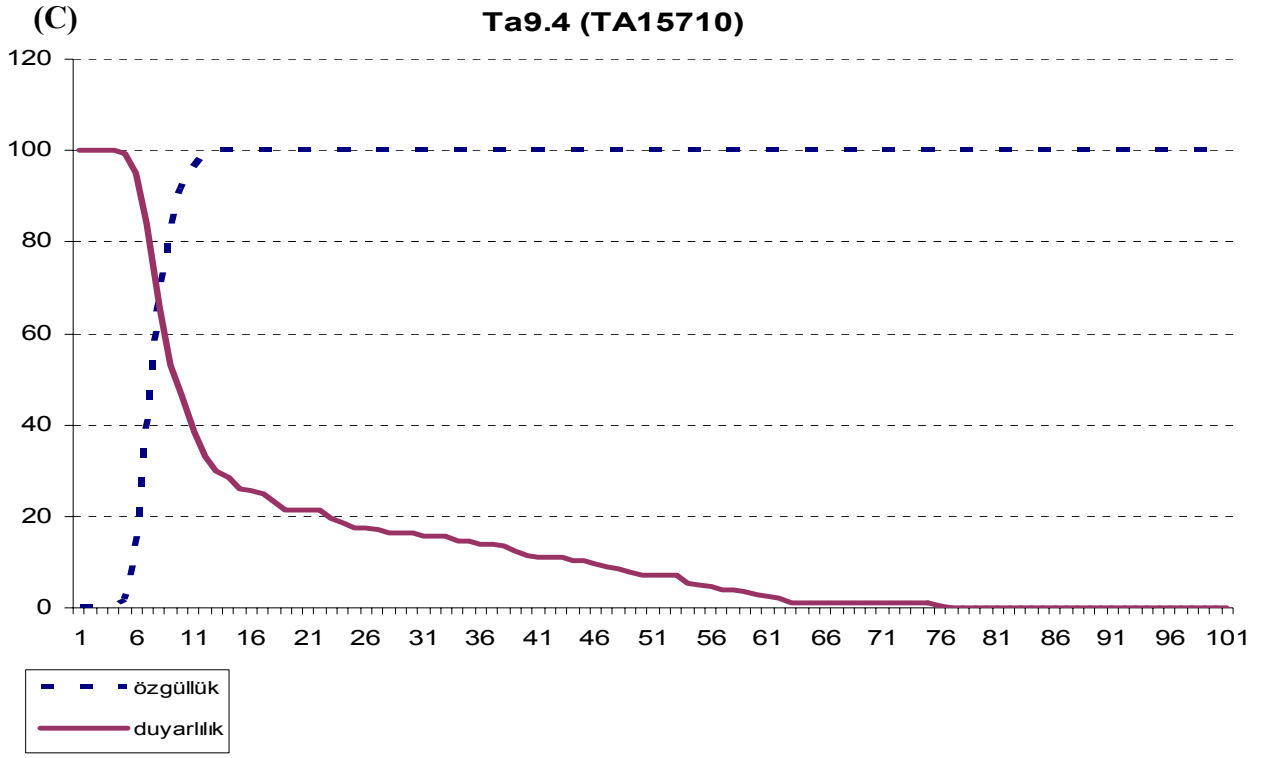


Şekil 2.C.3. TaSP (A), Ta9 (B) ve Ta9.4 (C) ELISA'nın *T. annulata* ile enfekte (pozitif, n=200) ve enfekte olmayan (negatif, n=180) sığır serumlarına ait yüzde pozitif (PP) verilerinin sıklık dağılımları.





Şekil 2.C.4. ELISA’da kullanılan rekombinant proteinlere (TaSP, Ta9 ve Ta9.4) ait TG–ROC analiz sonuçları. (*Devam*),



**Şekil 2.C.4.** ELISA'da kullanılan rekombinant proteinlere (TaSP, Ta9 ve Ta9.4) ait TG-ROC analiz sonuçları.

#### 2.4.2.4. Saha Serum Örneklerinin IFA ve ELISA Testi Sonuçları

355 saha örneğinde TaSP, Ta9 ve Ta9.4 ELISA yöntemi ile sırasıyla 18, 21 ve 11 cut-off noktaları kullanılarak belirlenen *T. annulata* enfeksiyonunun referans test olarak kullanılan makroşizont IFA testi sonuçları ile karşılaştırılması Çizelge 2.C.3'de verilmiştir. Makroşizont antijenleri kullanılarak yapılan IFA testi ile 233 hayvanda *T. annulata* enfeksiyonu belirlenmiş, 122 hayvan ise *T. annulata* yönünden negatif bulunmuştur. 233 hayvanın 89 tanesi tüm ELISA'larda pozitif, 59 tanesi tüm ELISA'larda negatif sonuç vermiş, kalan 85 hayvandan 28 tanesi sadece TaSP ELISA ile, 7 tanesi Ta9 ELISA ile, 7 tanesi Ta9.4 ELISA ile, 32 tanesi TaSP ve Ta9.4 ELISA'ların her ikisinde, 8 tanesi TaSP ve Ta9 ELISA'ların her ikisinde ve 3 tanesi de Ta9 ve Ta9.4 ELISA'ların her ikisinde birden pozitif bulunmuştur. IFA testi ile *T. annulata* yönünden negatif bulunan 122 hayvanın 66 tanesi TaSP, Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenleri ile yapılan ELISA'larda negatif sonuç verirken, 13 hayvan tüm ELISA'larda pozitif bulunmuştur. IFAT sonucu negatif olan kalan 43 hayvandan 4, 18, 6 tanesi sadece sırasıyla TaSP, Ta9 ve Ta9.4 ELISA'larda pozitif sonuç vermiş, bunun yanında 3, 4, 8 adet hayvan sırasıyla TaSP ve Ta9, TaSP ve Ta9.4, Ta9 ve Ta9.4 ELISA'larda pozitif bulunmuştur.

Her rekombinant protein ile elde edilen ELISA sonuçları ayrı ayrı IFAT ile karşılaştırıldığında, TaSP ELISA ile pozitif sonuç veren 182 hayvandan 24 tanesi IFA testi ile negatif sonuç vermiş, bununla birlikte TaSP ELISA ile negatif sonuç veren 173 hayvanın 76 tanesinde IFA testi ile pozitif bulunmuştur. Ta9 rekombinant antijeni kullanılarak yapılan ELISA sonucunda pozitif olduğu belirlenen 148 hayvanın 42 tanesi IFA testinde negatif sonuç verirken, Ta9 ELISA'da negatif sonuç veren 207 hayvandan 127 tanesi IFA testinde pozitif bulunmuştur. Ta9.4 ELISA ile pozitif olduğu belirlenen 168 hayvandan 33 tanesi IFA testi ile negatif bulunurken, Ta9.4 ELISA'da negatif sonuç veren 187 hayvandan 96 tanesi IFA testi ile pozitif sonuç vermiştir. Saha şartlarında enfekte hayvanlarda hastalığa karşı oluşan antikorm belirlenmesinde IFA testi TaSP, Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenleri kullanılarak yapılan ELISA testine göre daha fazla sayıda pozitiflik belirlemiştir ( $p < .05$ ).

**Çizelge 2.C.3.** TaSP, Ta9 ve Ta9.4 ELISA ve IFA testleri ile 355 saha örneğinde belirlenen *T.annulata* enfeksiyonunun karşılaştırılması

	<b>TaSP ELISA</b>			<b>Ta9 ELISA</b>			<b>Ta9.4 ELISA</b>		
	Pozitif	Negatif	<b>Toplam</b>	Pozitif	Negatif	<b>Toplam</b>	Pozitif	Negatif	<b>Toplam</b>
<b>IFAT</b>									
Pozitif	157	76	233	106	127	233	135	96	233
Negatif	24	98	122	42	80	122	33	89	122
<b>Toplam</b>	182	173	<b>355</b>	148	207	<b>355</b>	168	187	<b>355</b>

### 2.4.3. Tartışma

Akut theileriosis'in teşhisi şişkin lenf yumrularından hazırlanan biopsi materyalinde yada kan frotilerinde Giemsa boyamayla sırasıyla makroşizontların yada parazitin piroplasm formlarının görülmesi ile yapılabilmektedir. Kronik olguların tespiti, Giemsa boyalı preparatlarda piroplasmaların oldukça düşük sayılarda olmasından dolayı yapılamamaktadır. Ayrıca mikroskopik olarak diğer *Theileria* türlerinden ayırım genelde kolay olmamakta ve mikroskopik yöntemler hastalığın tam olarak belirlenmesine olanak vermemektedir (Ahmed ve ark 1997). Mikroskopik yöntemlerden kaynaklanan dezavantajların önüne geçebilmek için tropikal theileriosis'e yakalanan hayvanların tanısı serumda bulunan parazite özgü antikorların varlığının belirlenmesine yönelik indirek serolojik testlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Tropikal theileriosis'in endemik olarak görüldüğü bölgelerde hastalığı atlatan yada aşılı hayvanlarda *T. annulata*'ya karşı gelişen antikor varlığı serolojik testlerle belirlenerek hastalığın prevalansı ve/veya aşılama etkinliği ile oluşan enfeksiyonlara karşı verilen yanıt belirlenebilmektedir.

Komplement fikzasyon ve hemaglutinasyon inhibisyon gibi serolojik testler *Theileria*'ya karşı oluşan antikorların belirlenmesinde kullanılmış, ancak düşük özgüllüğe sahip olmalarından ötürü pek tercih edilmemişlerdir (Norval ve ark 1992). Bunun yanında serumda bulunan parazite özgü antikorların ve enfekte hayvanlardan hazırlanan biopsi materyalinde parazitlerin belirlenmesine olanak veren alkalen fosfataz anti alkalen fosfataz (APAAP) gibi immunohistokimyasal tekniklerden de yararlanılmıştır (Ahmed ve ark 1997). Işık mikroskop altında tanıya olanak veren, özgül, örneklerde hatalı pozitif ve negatifliklerin önüne geçen bu test her ne kadar enfekte hayvanlarda antikor varlığını tespit edebilsede parazitin farklı yaşam dönemlerine özgü antikorların tespitine, dolayısıyla kapsamlı bir epidemiyolojik çalışma yapılabilmesine olanak vermemektedir.

Piroplasm ya da makroşizont hücre kültürlerinden hazırlanan antijenler ile yapılan indirekt floresan antikor (IFAT) testi yaygın olarak kullanılan bir serolojik testtir. IFA testi, *T.annulata*'nın prevalans çalışmaları ve aşılama hayvanlardaki antikor yanıtının belirlenmesinde yoğun olarak kullanılan bir testtir (Pipano ve ark 1974). IFA testi mikroskopik bakıya nazaran daha pratik bir yöntemdir. Makroşizont hücre kültürlerinden hazırlanan antijenler kullanılarak yapılan IFA testi, piroplasm antijenleri ile yapılan nazaran tropikal theileriosis'e yeni yakalanan hayvanlarda parazitin makroşizont dönemine karşı gelişen antikor yanıtın, piroplasm dönemine karşı gelişen antikor yanıtına göre daha erken oluşmasından ötürü makroşizont IFA testini daha duyarlı kıldığı söylenmiştir (Darghouth ve

ark 1996a, Ilhan 1999). IFA testi parazitin farklı yaşam döngülerinde ortak olarak gözlenen antijenler ile reaksiyon göstermesinden dolayı aşılansmış/re enfekte olmamış hayvanların ne aşılı/re enfekte nede doğal olarak enfeksiyonu atlatıp bağışıklık kazanmış hayvanlardan ayırımını yapamamaktadır (Knight 1998). IFA testinin duyarlılığında örnekleme zamanının etkisinde göz önünde tutulması gerekmektedir (Ilhan 1999). IFA testi her ne kadar diğer kan parazitlerinin görülmediği ve uygun örnekleme zamanının belirlendiği bölgelerde tropikal theileriosis' in tanısında özgül olarak kullanılabilse de elde edilen veriler sadece bir prevalans çalışması olarak kalmaktadır. Hastalığın saha şartlarında kontrolünde uygulanabilecek programların belirlenmesinde o bölgedeki kullanılan aşılamların koruyuculuğu yada oluşabilecek epidemilerin kaynağını oluşturabilecek yeni parazit popülasyonlarında oluşabilecek muhtemel antijenik değişimler hakkında yeterli veriyi sağlayamamaktadır.

Parazitin attenüye edilmiş ve piroplasm oluşturmadığı düşünülen (Pipano 1977) hücre kültürleri ile aşılansmış hayvanlarda konak vücudunda parazitin sporozoit, meroziot ve piroplasm dönemlerine karşı bağışık yanıt oluşmazken, aşılansmış hayvanlarda bağışıklık sistemi sadece makroşizont döneminde sentezlenen proteinler ile karşılaşp bunlara karşı yanıt oluşturur. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda bu hayvanların ayırımının yapılması hastalığa karşı geliştirilecek kontrol programlarının belirlenmesinde önem taşımaktadır. Bu amaçla kullanılan ELISA, son yıllarda veteriner hekimlikte hastalıkların tanısı ve epidemiyolojik çalışmalarda giderek yaygın şekilde kullanım alanı bulmuştur (Voller ve ark 1976). ELISA, IFA testine nazaran daha duyarlı ve özgül olup, çok sayıda örneğin objektif olarak incelenmesine olanak vermektedir (Kemeny ve Chantler 1988).

Parazitin şizont veya piroplasm dönemlerine ait ham antijenler kullanılarak yapılan ELISA ile elde edilen sonuçların IFA testi ile elde edilenlere nazaran daha duyarlı, objektif, gerçekçi ve özgül olduğu bilinmektedir (Beniwal ve ark 1997). Ham haldeki çözünür piroplasm, hücresel şizont ve çözünür şizont antijenlerinin ELISA ile *Theileria*'ya karşı oluşan antikorları belirliyebilmesine karşın parazitin farklı dönemlerinde ortak olarak görülen bazı antijenlere bağlı olarak sporozoitler ile enfekte yada şizontlarla aşılansmış hayvanlarda antikor seviyelerinin arasında ayırıcı bir fark gözlenmemektedir (Manuja ve ark 2000). Bunun yanında ham piroplasm antijenleri kullanılarak yapılan ELISA *T. parva* ile çapraz reaksiyonlar oluşmaktadır (Gray ve ark 1980, Kachani ve ark 1992b). Tropikal theileriosis'e karşı uygulanacak aşılama programlarının oluşturulabilmesi amacıyla yapılan epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilir bir diğer yöntemde parazitin farklı yaşam dönemlerine özgü antijenlerin bir arada kullanılarak test edilen serum örnekleri hakkında daha kapsamlı bilgi edinilmesidir.

Bu güne kadarki çalışmalarda parazitin omurgalı konaktaki farklı yaşam dönemlerine (sporozoit, makroşizont, merozoit/piroplasm) özgü rekombinant proteinler hastalığın serolojik olarak ELISA ile teşhisinde kullanılmıştır (Matita 1994, İlhan 1999, Gubbels ve ark 2000, Bakheit ve ark 2004). *Theileria annulata*'nın sporozoit yüzey antijeni; SPAG-1 rekombinant proteini kullanılarak yapılan indirekt ELISA'larda bu proteinin doğal şartlarda tekrarlı kene enfestasyonuna maruz kalmamış hayvanlarda bağışıklık sisteminin sporozoitlere maruz kalma süresinin kısa (azami 10 dakika) olmasından (Boulter ve ark 1999) dolayı antikor miktarı hızlı şekilde tespit sınırlarının altına düştüğü için antikor miktarının tanı için yeterli düzeyde olmadığı görülmüştür (Matita 1994, Williamson ve ark 1994). Merozoit rhoptri antijeni; Tamr-1 (Shiels ve ark 1994) kullanılarak yapılan ELISA testi ile bu proteinin tanı için uygun olduğu belirtilmiştir (Matita 1994). Ancak, diğer bir çalışmada antijenin sporozoit ile enfekte hayvanları belirleyebildiği, ancak attenüye hücre kültür ile aşılanan hayvanlarda proteine karşı gelişen antikor yanıtın yeterli düzeyde olmadığı, ayrıca *T. parva*, *T. buffeli*, *Babesia bovis* ve *Trypanosoma* ile çapraz reaksiyon verdiği (İlhan 1999) ve Tamr-1 ELISA ile elde edilen duyarlılığın IFA testine nazaran daha düşük seyrettiği ve IFA testinin daha güvenilir olduğu belirtilmiştir (İlhan 1999). *T. annulata*'nın immunodominant merozoit/piroplasm yüzey antijeni; Tams-1 (Gubbels ve ark 2000, (Glascodine ve ark 1990) proteinin antijenik özelliğinden dolayı ELISA gibi tanısal amaçlı serolojik testlerde duyarlı ve özgül olarak kullanılabileceği öngörülmüş (Jongejan ve ark 1994), ancak enfekte hayvanlarda üç aydan önceki dönemlerde IFA testi daha güvenilir sonuç verdiği görülmüştür (Gubbels ve ark 2000). Tams-1 antijenine karşı gelişen antikor titresi uzun süre (yaklaşık bir yıl süreyle) vücutta yüksek düzeylerde seyretmesinden dolayı enfeksiyona yeni yakalanmış hayvanların taşıyıcı durumdaki hayvanlardan ayırımını zorlaştırmaktadır. Buna ilave olarak, *T. parva*'nın bazı suşları ile çapraz reaksiyon vermektedir (Gubbels ve ark 2000).

*Theileria annulata* yüzey antijeni olarak bilinen TaSP molekülüne karşı gelişen güçlü humoral yanıt *T. annulata*'nın serolojik olarak indirekt ELISA yöntemi ile teşhisi için uygun bir protein olduğunu düşündürmüştür (Bakheit ve ark 2004). TaSP ELISA sığırlarda yaygın olarak görülen *Babesia bovis* ile çapraz reaksiyon vermemesine karşın, *T. parva* ile deneysel enfekte hayvanlarda elde edilen serum örnekleri ile yüksek oranda ve buna ilaveten *Trypanosoma* ile çapraz reaksiyon vermektedir (Renneker ve ark 2008). TaSP molekülünün ELISA'da *T. parva* ile enfekte serumlarla gösterdiği çapraz reaksiyonun önlenmesi ve özgüllüğünün artırılması amacıyla TaSP molekülüne özgül olduğu belirtilen 1C7 monoklonal antikoru (Shiels ve ark 1986) kullanılarak geliştirilen kompetitif ELISA (cELISA) sonucunda testin özgüllüğü %100 olurken, duyarlılığı (%77) oldukça düşmüştür (Renneker ve ark 2008).

Geliştirilen cELISA *T. parva*'nın yanında *Trypanosoma*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* ve *Anaplasma* türleri ile çapraz reaksiyon vermemektedir (Renneker ve ark 2009). Bununla birlikte, indirek ELISA referans alınarak cELISA ile yapılan epidemiyolojik çalışmalarda testin duyarlılığının ve özgüllüğünün sırasıyla %82 ve %52 olduğu belirlenmiştir. Düşük duyarlılığına bağlı olarak cELISA tekniği saha şartlarında ancak indirek ELISA ve/veya IFAT gibi referans testler ile beraber kullanılabilir.

*Theileria annulata*'nın sporozoit, makroşizont ve piroplasm dönemlerinde ortak sentezlenen, 19,5 kDa moleküler ağırlığında, dimerik yapıya sahip TaD (Schneider ve ark 2004) ve 37 kDa ağırlığında, piroplazm ve makroşizont dönemlerinde sentezlenen ve farklı parazit suşları arasında yüksek oranda (%95) korunmuş olan *T. annulata* proteini (TaSE) molekülleri (Schneider ve ark 2007) bulunmaktadır. *T. annulata* ile enfekte hayvan serumu kullanılarak yapılan değerlendirmede TaD ve TaSE rekombinant proteinlerine karşı serum antikor titresi oldukça düşük çıkmıştır (Seitzer ve ark 2008). Özellikle, *T. annulata*'nın genomik diziliminin belirlenmesi (Pain ve ark 2005) ve biyoinformatik yöntemlerin yardımı ile parazitin farklı dönemlerinde yüksek oranda sentezlenen, dizilimde belli amino asit alanlarına sahip antijenik özellikleri olan proteinlerin belirlenmesine olanak sağlamıştır. Bu proteinler arasında 23 kDa'luk piroplasm yüzey proteini, Mero1, sub-telomerik bölgede bulunan *SVSP* gen ailesi içinde belli genler arasındaki korunmuş bölgelerin sentezlediği ortak protein bölgelerinin rekombinant proteinleri, RP2 ve RP4 (Weir 2006) bulunmaktadır. Bununla birlikte Mero1, RP2 ve RP4 proteinlerine karşı gelişen bağışık yanıt ve bunların serolojik testlerde tanı amaçlı kullanılması ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada deneysel enfekte serumlar ile yapılan Western blot sonucunda RP2 ve 4 rekombinant proteinlerine karşı hayvanlarda bir yanıt oluşmaması, Mero1 rekombinat proteinine karşı sınırlı antikor yanıt gözlenmesi bu proteinlerin ELISA testi ile tanısal amaçlı kullanıma uygun olmadıklarını göstermiştir (Bknz. 2.2/Bulgular).

Bu kısımda üç farklı rekombinant antijen olan TaSP, Ta9 ve Ta9.4'ün serolojik olarak ELISA yöntemi ile tropikal theileriosis'in endemik olarak görüldüğü bölgelerde saha şartlarında enfekte hayvanları belirlemedeki verimliliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda sığırlardan toplanan serum örnekleri doku kültüründen hazırlanan makroşizont antijenleri ile kapanan lamalar kullanılarak IFA ve yukarıda belirtilen antijenlerle kaplı plaklar kullanılarak indirek ELISA testleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. TA06510 ELISA'da sporozoitler ile enfekte hayvanlarda rekombinant antijenine karşı düşük IgG yanıt oluşmasından dolayı bu protein ileriki aşamalarda kullanılmamıştır.



İndirek ELISA protokolünde farklı antijenler için aynı inkübasyon süreleri ve substrat dilüsyonu kullanılmıştır. Bununla birlikte kullanılan antijen ve birincil antikor (enfekte serum) dilüsyonları ayrı ayrı titre edilerek optimal dilüsyonlar belirlenmiştir (Çizelge 2.C.1). Hem Ta9 ve Ta9.4 hemde TaSP rekombinant antijenleri ile yapılan ELISA'lar da kullanılan pozitif kontrol serum örnekleri (C++) oldukça yüksek OD değerleri vermiştir. ELISA'nın optimizasyonunda yüksek affiniteli serum örneklerinin kullanılması testin duyarlılığını etkileyebilmektedir. Bununla birlikte özellikle hayvanlar arasında belli bir antijene karşı değişik düzeylerde oluşan bağışık yanıt testin optimizasyonunda kullanılacak serum örneklerinin seçimini güçleştirmektedir. Bu yüzden ELISA testinin optimizasyonunda yüksek affiniteli serum örnekleri seçilmiştir. Düşük antijen konsantrasyonu ve yüksek serum dilüsyonlarında yüksek affiniteli antikorlar daha iyi belirlenmektedir (İlhan 1999).

Ta9.4 ELISA, Ta9 ile karşılaştırıldığında negatif serumla daha yoğun bir arka plan oluşturmuştur. ELISA yönteminde testin optimizasyonunu etkileyen faktörler arasında; kullanılan plakların yapısı, menisküs oluşumu, tampon solüsyonların miktar, içerik ve pH'ları, inkübasyon süre ve dereceleri gibi bir çok değişken bulunmaktadır (Wright 1987, Kemeny 1992, Venkatesan ve Wakelin 1993). Kullanılan plakların antijen ve antikor bağlama kapasiteleri önemli oranda farklılıklar göstermekte ve aynı zamanda plakların kimyasal yapısında zaman içinde modifikasyonlar oluşabilmektedir (Wright 1987). ELISA testinde değişkenliğe yol açan bir diğer etmende plak gözlerindeki menisküs (bir tarafı iç bükey diğeri dış bükey mercek) oluşumudur. Menisküs, testte kullanılan tampon solüsyonlar içerisinde yer alan deterjanların (Örn.; Tween) yüzey gerilimlerini azaltması sonucu kaçınılmaz olarak ELISA'da oluşmaktadır (Wright 1987). Etkisi iki türdür; i) plak gözlerinden vertikal ışığın geçisi esnasında, menisküs ayrı bir lens görevi yapmakta, ii) konkav menisküs oluşmuş plak gözünden geçen ışığın katettiği yol, menisküs oluşmamış plak gözüne nazaran daha kısalmaktadır. ELISA testinde, organik moleküllerin pasif absorpsiyonu, antijen-antikor bağlanması ve enzimatik reaksiyonların hepsi ısı temelli tepkimelerdir. Testin optimizasyonunda tüm reaksiyonlar ile kullanılan solüsyonların aynı ısıda olması önemlidir (Wright 1987). Proteinlerin bağlanması amacıyla kullanılan solüsyon ve bunun pH'sı antijenlerin konformasyonel yapısı ile hem plağın hemde proteinin yüküne etki ederek antijenin hatalı bükülmesine bağlı özgül olmayan bağlanmalara veya antijenlerin plaklara hiç bağlanamamasına yol açabilmektedir. Bunun yanında inkübasyon süresi ve dereceleri ile kullanılan solüsyon miktarı hem serumda bulunan özgül antikorların bağlanması için gerekli kinetiği etkilemekte hemde antikorların affinitelerinin azalmasına yol açarak oluşacak özgül antijen-antikor kompleksini dolayısıyla reaksiyon sonrası elde edilecek sonuçları

etkileyebilmektedir (Kuen ve ark 1993). Tüm bu değişkenler optimum şartlarda minimize edilmiş olmasına karşın Ta9.4 ELISA'da oluşan daha yoğun arka plan bağlanmalarının azaltılması amacıyla bloklama solüsyonunda kullanılan yağsız süt ve Tween 20 gibi özgül olmayan bağlanmaları önleyen maddelerin farklı dilüsyonları ile kullanılan antijenlerin farklı plaklara bağlanma kapasiteleri zaman kısıtlamasından dolayı denenememiştir. İleride yapılacak olan çalışmalarda ELISA testini etkileyerek, varyasyonlara yol açabilecek tüm değişkenler maksimum verimlilik sağlanması için minimize edilmelidir.

Bu çalışmada sporozoit ve yüksek pasajlı hücre kültürleri ile deneysel olarak enfeksiyona tabi tutulduktan sonra sporozoitler ile re enfekte edilen hayvanlardan elde edilen serumlar kullanılarak, TaSP, Ta9, Ta9.4 ile TA06510 rekombinat proteinlerine karşı doğal enfekte ve aşılı hayvanlarda gelişen humoral yanıt OD değerleri baz alınarak incelenmiştir. Sporozoitler ile enfekte hayvanların tümünde sabit serum (1/160) ve konjugat dilüsyonları (1/80) kullanılarak IFA testi ile yapılan değerlendirme sonucunda enfeksiyon sonrası 56. günde pozitiflik gözlenirken, sadece bir hayvanda (48C) 28. günde pozitiflik belirlenmiştir. TaSP ELISA, IFA testi ile benzer şekilde sporozoit ile enfekte hayvanların tümünü erken dönemde belirleyebilmiştir. 23B nolu hayvanda OD değerleri baz alındığında TaSP ELISA'da rekombinant proteinine karşı gelişen antikor yanıt enfeksiyon öncesi döneme göre en az iki kat fazla olmakla birlikte diğer hayvanlarla karşılaştırıldığında genelde daha düşük seyretmiştir. TaSP rekombinant proteinine karşı sporozoitler ile enfekte hayvanların tümünde antikor yanıt oluşmuş ve enfeksiyon sonrası 90. günden itibaren yapılan tedaviye (Ilhan 1999) bağlı olarak giderek azalmıştır. Bununla birlikte *T. annulata* Gharb sporozoit stabilatı (Ilhan 1999) ile oluşturulan re enfeksiyon sonrası antikor yanıt tüm hayvanlarda tekrar yükselmiştir. Primer enfeksiyon esnasında hayvanlar arasında antijene karşı oluşan bağışık yanıtta; parazit ve konak popülasyonlarındaki genetik çeşitlilik, parazit proteomunun kompleks oluşu ve özgül antikor yanıtın oluşum aşamalarındaki değişkenlikler bireyler arasındaki bağışık yanıtta farklılıklara yol açmaktadır (Gray ve ark 2007). TaSP molekülünün merkezi polimorfik kısmı, farklı izolatlar arasında büyüklük ve dizilim yönünden farklılıklar göstermektedir (Awadia ve ark 2008). Gerek *T. annulata* Gharb sporozoit stabilatı ile oluşturulan re enfeksiyona ve gerekse de bireysel farklılıklara bağlı olarak tüm hayvanlarda re enfeksiyon sonrasında TaSP rekombinant antijenine karşı daha yüksek antikor yanıt oluşmuştur.

Ta9 ve Ta9.4 ELISA'lar da 48C haricindeki diğer hayvanlardaki antikor seviyeleri enfeksiyon öncesi dönemdeki OD değerlerine yakın seyretmiştir. Re enfeksiyon sonrasında ise Ta9 ELISA'da 21A nolu hayvan haricinde diğer tüm hayvanlardaki IgG seviyeleri yükselmiştir, bununla birlikte Ta9.4 ELISA'da tüm hayvanlardaki IgG seviyeleri

yükselmiştir. Ta9 (TA15705) proteini, *T. annulata*'nın farklı allerleri arasında özellikle proteinin PQ (Prolin ve Glutamin) zengin merkezi kısmındaki 335–391. amino asitler arasında uzunluk farklılıkları ve amino asit ilaveleri bulunmaktadır. Ta9'un, *T. parva* genomundaki ortolog genler ile 334–369. amino asitler arasında benzerlik göstermektedir (Şekil 2.B.9, A). Ta9 proteini, makroşizontlar ile enfekte hücre yüzeyinde MHC sınıf I molekülleri tarafından T hücrelerine sunulan proteinlerden biridir ve bu proteine karşı gelişen T hücre yanıtı *T. annulata*'nın farklı stokları arasında değişkenlik göstermektedir (Weir W, yayınlamamış veri). Ta9.4 (TA15710) proteininin farklı coğrafik bölgeler ile aynı bölgenin farklı yörelerine ait izolatlar arasında özellikle 140–230. amino asitler arasında uzunluk farklılıkları göstermekte, özellikle proteinin merkezi kısmının N ve C terminale yakın bölgelerinde amino asit ilaveleri bulunmaktadır (Şekil 2.B.9, B ve Şekil 2.B.10). Bununla birlikte Ta9.4 proteini farklı izolatlar arasında, Ta9 kadar polimorfizm göstermemektedir.

Hayvanlar arasındaki bireysel farklılıklar, protein düzeyinde farklı alleller ile farklı stoklar arasında görülen polimorfizm ile Ta9 proteininin MHC molekülleri tarafından enfekte hücre yüzeyinde T hücrelerine sunuluyor olması; Ta9 ve onun paraloğu olan Ta9.4 proteinlerinin, TaSP molekülünden farklı olarak primer enfeksiyon döneminde daha çok hücresel yanıtta sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte 48C no'lu hayvanda gözlenen yüksek antikor yanıt enfekte hücre yüzeyinde sunulan proteinlerin CD<sup>+8</sup> T hücrelerinden (CTL) ziyade naif T hücrelerince (T<sub>0</sub>) belirlendiğini yada hücelerde yoğun olarak eksprese edilen bu proteinlerin (Weir 2006 ve mikroarray analiz sonuçları) sitotoksik yanıtta bağlı lize olduktan sonra B hücrelerince yanıt oluştuğunu akla getirmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda, MHC sınıf I aracılı CTL yanıt sadece bağışık hayvanlarda gelişirken, hasta yada duyarlı olanlar da bu yanıtta rastlanmayacağı vurgulanmıştır (Seitzer ve Ahmed 2008). Enfeksiyon sonrası 90. günden itibaren yapılan tedaviye bağlı olarak (Ilhan 1999) tüm hayvanlarda oluşturulan re enfeksiyon sonrasında Ta9 ve Ta9.4 antijenlerine karşı oluşan antikor yanıt artmıştır. Bununla birlikte 48C no'lu hayvanda Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenlerine karşı primer enfeksiyon esnasında gözlenen yüksek antikor yanıtın muhtemel sebebi tam anlaşılamamıştır.

Aşılanmış hayvanlara ait serum örneklerinde TaSP ELISA'da Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenleri ile karşılaştırıldığında daha iyi bir bağışık yanıt oluşmuş ve hayvanlardaki antikor seviyeleri yüksek çıkmıştır. Bununla birlikte Ta9.4 ELISA (54C hariç) ve Ta9 ELISA'da aşılanmış hayvanlarda primer enfeksiyon döneminde bağışık yanıt enfeksiyon öncesi döneme benzer seyrederken, re enfeksiyon sonrasında antijenlere karşı gelişen antikor seviyesi hayvanların çoğunda yükselmiştir. Aşılamadan sonraki dönemde antikorun

özelliğindeki ileri düzeylerdeki değişime bağlı antikor seviyeleri artmaktadır (İlhan 1999). Düşük affiniteli antikorlar özellikle enfeksiyondan hemen sonra üretilirken, yüksek affiniteye sahip olanlar enfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde üretilmektedir (Roitt 1994). İmmunolojide 'affinite maturasyonu' olarak adlandırılan bu olguda B hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir. B hücreleri enfeksiyonun erken döneminde bağışık yanıtın oluşması esnasında düşük affiniteye sahip antikorları sentezlemektedir. Bununla birlikte bağışıklık sisteminin aynı antijene tekrarlı olarak maruz kalmasına bağlı olarak konak tarafından somatik hipermutasyon (SHM) ve klonal seleksiyona bağlı (Teng ve Papavasiliou 2007) daha yüksek affiniteye sahip antikorlar üretilmektedir. Bağışıklık sistemi tarafından ikincil enfeksiyon sonrasında, ilk enfeksiyona göre logaritmik olarak çok daha yüksek affiniteye sahip antikorlar üretmektedir. Antikor affinitesinin yanında, bağışık hayvanlarda geliştiği bilinen MHC sınıf I aracılı CTL yanıt (Seitzer ve Ahmed 2008) hem farklı suşlar arasında hemde klonlanmış parazit populasyonlarında heterojite göstermektedir (Darghouth 2008, Machugh ve ark 2008). Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenlerine karşı aşılı hayvanlarda, enfeksiyon sonrası 90.ıncı günde tedavi uygulanan sporozoitle enfekte hayvanlara (48C hariç) benzer şekilde primer enfeksiyon esnasında düşük olan antikor yanıtın re enfeksiyon sonrası artması bağışıklıkta T<sub>0</sub> hücrelerinin CTL hücrelerine nazaran daha etkin rol oynamasından kaynaklanmış olabilir. Bununla birlikte bu değerlendirmeler yapılacak kapsamlı çalışmalarda elde edilecek verilerle desteklenmelidir.

Serolojik testlerde temel nokta tanıda kullanılan cut-off'un belirlenmesidir (Vizard ve ark 1990). Serolojik bir testin saha şartlarında ve/ veya deneysel serumlar ile enfekte olan ve enfekte olmayan hayvanların ayırımında kullanılabilir olması için güvenilir bir cut-off noktasına sahip olmalıdır (Mboloi ve ark 1999, Vizard ve ark 1990). Bu çalışmada, *T.annulata* ile enfekte (pozitif, n=200) ve enfekte olmayan (negatif, n=180) serum örneği ELISA'da kullanılacak TaSP, Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenlerine ait cut-off değerlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. TaSP ELISA için belirlenen 18 PP cut-off noktasında testin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %89.5 ve %98.3 olarak belirlenmiştir. Ta9 rekombinant antijeni kullanılarak yapılan ELISA için belirlenen 21 PP cut-off noktasında testin özgüllüğü %95.6 olurken, duyarlılık %28.5 gibi oldukça düşük bir değer almıştır. Ta9.4 ELISA için belirlenen 11PP cut-off noktasında testin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %35 ve %97 olarak belirlenmiştir. Duyarlılığın arttırması amacıyla daha düşük bir PP değerinin seçilmesi testin özgüllüğünü azalttığı için daha düşük bir cut-off noktası seçilmemiştir.

Cut-off noktasının belirlenmesinde kullanılan örnek büyüklüğü beklenmeyen değişkenliklerin önlenmesi için yeterli sayıda ve kullanılan referans serum örnekleri hedef

populasyonu temsil edebilecek sayıda olmalıdır (Metz 1998, Greiner ve ark 1994). Tanısal amaçlı kullanılan testin duyarlılık ve özgüllüğünü etkileyebilecek bir çok farklı faktörü dengeleyebilmek için en az 300 bilinen pozitif ve 1000 bilinen negatif örnek kullanılması önerilmektedir (Jacobson 1996). Bu çalışmada cut-off noktasının belirlenmesi amacıyla kullanılan negatif (n=180) ve pozitif (n=200) serum sayısı yukarıda önerilen sayıdan özellikle negatif serumlar bakımından oldukça düşüktür. Bununla birlikte belirtilen negatif serum sayısına ulaşmak normal şartlarda oldukça zahmetli ve uzun süreler gerektirmektedir. Negatif serumların elde edilmesinde kullanılabilir en güvenilir yol deneysel olarak kontrol altında tutulan hayvanlardan elde edilecek serum örneklerinin IFA testi ile değerlendirilmelerinin ardından referans olarak kullanılabilir. Bu yöntem özellikle negatif serumların elde edilmesinde oldukça güvenilir olmasına karşın, çok zahmetli ve zaman alıcıdır. Bunun yanında bir yada birkaç parazit populasyonu kullanılarak oluşturulacak deneysel enfeksiyonda elde edilen referans pozitif serum örneklerinin saha şartlarında oldukça yoğun olarak görülen farklı parazit populasyonlarını temsil edebilmesinde oldukça güçtür (Greiner ve ark 1997). Kullanılacak referans serumlar *T. annulata*'nın görülmediği, bilinen bölgeler ile hastalığın endemik olarak görüldüğü bölgelerden de toplanabilmektedir. Ancak toplanan örneklerin pozitif ve negatifliklerinin belirlenmesinde kullanılan IFA testi diğer *Theileria* türleri ile çapraz reaksiyonlar verebilmektedir (Kiltz ve ark 1986). Bu durum özellikle pozitif referans serum örnekleri açısından sorun oluşturmaktadır.

PIM ortoloğu olduğu düşünülen, yüksek immünojenik özellikteki TaSP molekülüne karşı oluşan güçlü humoral yanıt *T. annulata*'nın serolojik olarak indirekt ELISA yöntemi ile teşhisi için uygun bir protein olduğunu düşündürmüştür (Bakheit ve ark., 2004). Proteinin merkezi polimorfik kısmında yer alan ve *T. annulata*'nın farklı suşları arasında ortak olduğu düşünülen epitopların var olduğu düşünülerek TaSP ELISA'nın tüm coğrafik bölgelerde hastalığın teşhisine uygun olduğu ileri sürülmüştür (Bakheit ve ark., 2004). IFA testi referans alınarak değerlendirilen serum örneklerinin, TaSP rekombinant proteini kullanılarak yapılan indirekt ELISA testlerinde molekülün *T. annulata*'nın teşhisinde duyarlı (%92–99) ve özgül (%90–98) olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir (Bakheit ve ark 2004, Salih ve ark 2005a,b, 2007). 50 negatif ve 140 saha serumu kullanılarak yapılan denemede TaSP ELISA'nın duyarlılığı %99 bulunurken, özgüllüğünün %90 olduğu belirlenmiştir (Bakheit ve ark 2004), ancak bu çalışmada gerek negatif örnek sayısının azlığı gerekse testin standardizasyonunda kullanılan pozitif sonuç veren 120 örnek kullanılması duyarlılığı hatalı şekilde yükseltmiştir. Bir diğer çalışmada ise hastalığın endemik olmadığı bölgeden toplanan 120 negatif, 80 pozitif serum kullanılmış ve TaSP rekombinant antijeni kullanılarak yapılan ELISA testinin %93

duyarlılık ve özgüllükte olduğu belirlenmiştir (Salih ve ark 2005b). Bu çalışmada, güvenilirliği bilinen deneysel çalışmalarda elde edilmiş 180 negatif ve 200 pozitif serum kullanılarak TaSP ELISA için belirlenen 18PP cut-off noktasında duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %89.5 ve %98.3 olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında kullanılan negatif ve pozitif serum örneğinin sayısının testin duyarlılık ve özgüllüğünü oldukça değiştirdiği görülmektedir. Tanısal amaçlı serolojik testlerde kullanılan Tams-1 (Glascodine ve ark 1990), Tamr-1 (Shiels ve ark 1994) ve SPAG-1 (Williamson ve ark 1989) rekombinat antijenleri ile yapılan ELISA testlerinde ise az sayıda deneysel enfekte serum örneği kullanılmıştır (Gubbels ve ark 2000, Matita 1994, Williamson ve ark 1994). Bunun yanında Tamr-1 rekombinat antijeni kullanılarak yapılan ELISA standardizasyonunda kullanılan 200 negatif ve pozitif örneğin testin duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesinde yeterli olamayacağı ve daha fazla örneğin kullanılması gerektiği vurgulanmıştır (İlhan 1999). Optimum cut-off değerinin belirlenmesinde populasyon yoğunluğunun doğru şekilde değerlendirilmeli ve elde edilen veri sayısı arttıkça tanısal testlerde kullanılan cut-off değerleri tekrar gözden geçirilip düzenlenmelidir (Vizard ve ark 1990). Bu çalışmada kullanılan örnek sayısı her ne kadar belli bir populasyon yoğunluğunu ifade ediyor olsa da tropikal theileriosis' in endemik olarak görüldüğü geniş coğrafik alan ve buradaki hayvan varlığı göz önüne alındığında örnek sayısının çoğaltılarak testlerin tanısal verimliliğinin artırması ve hatalı sonuçlardan kaynaklanabilecek zararların minimize edilmesi önem taşımaktadır. ELISA testinin standardizasyonunda önemli olan bir diğer noktada kullanılan rekombinant antijen ile diğer türler arasında görülebilecek olan muhtemel çapraz reaksiyonların değerlendirilmesidir. Ancak bu çalışmada kullanılan rekombinant antijenler (TaSP, Ta9 ve Ta9.4) diğer türlere ait deneysel serum örnekleri bulunmaması nedeniyle ileride yapılacak çalışmalarda değerlendirilmesi planlanmıştır.

355 saha örneğinde TaSP, Ta9 ve Ta9.4 ELISA yöntemi ile sırasıyla 18, 21 ve 11 cut-off değerlerinde *T. annulata*'ya karşı gelişen antikörlerin tespiti yapılmış ve referans test olarak kabul edilen makrozizont IFA testi ile karşılaştırılmıştır.

Referans test olarak kullanılan IFA testi ile 233 hayvanda *T. annulata* enfeksiyonu belirlenmiş, 122 hayvan ise *T. annulata* yönünden negatif bulunmuştur. *Theileria annulata* enfeksiyonu belirlenen 233 hayvanın 174 tanesi en az bir rekombinant antijen kullanılarak yapılan ELISA testi ile pozitif bulunmuş, bununla birlikte 59 hayvan ise tüm ELISA' larda negatif sonuç vermiştir. IFA testi ile *T. annulata* yönünden negatif bulunan 122 hayvanın 66 tanesi TaSP, Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenleri ile yapılan ELISA' larda negatif sonuç verirken, 56 tanesi en az ELISA testi ile pozitif bulunmuştur.

Saha şartlarında enfeksiyonun belirlenmesinde, ELISA testleri arasında duyalılığı en yüksek olanının TaSP rekombinant proteini kullanılarak yapılan ELISA olduğu belirlenmiştir. Ancak sonuçlar incelendiğinde IFA testi ve diğer ELISA'ların (Ta9 ve Ta9.4) bir veya ikisiyle pozitif sonuç veren örneklerin TaSP ELISA ile negatif bulunması bize TaSP rekombinant antijenine karşı hayvanlarda gelişen bağışık yanıtın farklılıklar gösterdiğini düşündürmektedir. TaSP molekülün polimorfik kısmının farklı izolatlar arasında (izolatın coğrafik yerine bakmaksızın) büyüklük ve dizilim yönünden farklılıklar göstermesi (Awadia ve ark 2008), bazı hayvanlarda *T. annulata*'ya karşı oluşan antikörlerin yarılanma ömürlerinin oldukça kısa olması ve/veya oldukça düşük seviyelerde olmalarına bağlı IFA ve TaSP ELISA ile tespit edilemeyebilmeleri (Salih ve ark 2007) ve bu çalışmada hayvanlar arasında diğer antijenlere (Ta9 ve Ta9.4) ve IFA testinde pozitiflik gösterirken TaSP ELISA'da tespit edilememesi parazit popülasyonunda gerek inter ve/veya intragenik rekombinasyonlar gerekse seksüel rekombinasyon ve belli bölgelerdeki selektif amino asit değişimlerine bağlı (Gubbels ve ark 2000, Schnittger ve ark 2002) genetik farklılıkların artmış olabileceğini düşündürmektedir.

Parazite ait genom dizilimi ve parazitin farklı dönemlerine ait EST verileri (Pain ve ark 2005) ile mikroarray sonuçları (Weir W, yayınlanmamış veri) kimi proteinlerin parazitin farklı yaşam dönemlerinde ortak, kiminin ise sadece belli yaşam dönemlerine özgü olduğunu göstermiştir. Bunun yanında parazite ait farklı yaşam dönemlerinde ortak olarak sentezlenen proteinlerin seviyeleri her yaşam döneminde aynı oranda olabildiği gibi farklı düzeylerde de sentezlenebilmekte, aynı zamanda Tams-1 ve TaSP moleküllerinde olduğu gibi bu proteinler parazitin farklı suşları hatta aynı izolata ait klonlar arasında rekombinasyonlara bağlı (Gubbels ve ark 2000, Schnittger ve ark 2002) polimorfizm gösterebilmektedir. Bu doğrultuda saha şartlarında aşılı ve/veya doğal enfekte hayvanların ELISA gibi serolojik testlerde ayırımı yapabilecek parazit kökenli proteinlerin ileride yapılacak daha kapsamlı çalışmalar ile tekrar değerlendirilmesi gerektiği görülmektedir.

Sonuç olarak; IFA testi, TaSP, Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenleri kullanılarak yapılan ELISA testlerine göre saha şartlarında enfekte hayvanlarda göre daha fazla sayıda pozitiflik belirlenmiştir ( $p < .05$ ). Bununla birlikte *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* etkenlerinin hayvanlarda teşhisinde kullanılan IFA testinde türler arasında çapraz reaksiyonlar (Burridge ve ark 1974, Kiltz ve ark 1986, Kocan ve ark 2000, Molad ve ark 2006) göstermesi hastalıkların ayırıcı tanısında özgül sonuçlar elde edilmesini engellemektedir. Aynı zamanda vücutlarında paraziti taşıyan hayvanlarda antikör seviyeleri giderek azalmakta (Darghouth ve ark 1996a,b) ve serolojik olarak negatif sonuç vermelerine karşın halen daha piroplasmları

kenelere aktarabilmektedirler (Kirvar ve ark 2000). Hem bahsedilen taşıyıcı hayvanlarda antikor seviyelerinin belirlenemeyen seviyelere düşmesi hemde *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* etkenlerinin bölgemizde yaygın olarak görülmesi IFA testi ile pozitif olup ELISA testlerinin negatif sonuç veren örneklerde parazitin varlığının PZR gibi moleküler testler ile belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.



## BÖLÜM 3. TROPİKAL THEİLERİOSİS'İN TEŞHİSİNDE MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİNİN KULLANIMI

### 3.1. Genel Bilgi

Tropical theileriosis yüksek verimli ırkların geliştirilmesi için uygulanan yetiştiricilik programları için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Akut olgularda duyarlı hayvanlarda ölümle sonuçlanabilen tablo oluşturmakta, hastalığı atlatanlarda ise uzun süren bir nekahat dönemi ile birlikte verim düşüklüğü, büyüme geriliği, abort tablosu görülmektedir (Uilenberg 1981). *T.annulata*, ara konak keneler ve son konak sığırlarda sırasıyla gametogoni, sporogoni, şizogoni ve merogoni dönemlerini geçirmektedir. Hastalığın naklinde en önemli rolü, hastalığa karşı dirençli olup herhangi bir klinik tablo göstermeksizin, vücutlarında eritrositler içinde etkenin piroplasm formlarını taşıyan hayvanlar oynamaktadır (Neitz 1957). Klinik vakaların belirlenmesinde en sık kullanılan yöntem şüpheli hayvanların kan örneklerinden ya da şişkin lenf yumrularından alınan biyopsi örneklerinden hazırlanan preparatların Giemsa boyama yöntemi ile boyandıktan sonra parazite ait sırası ile eritrositler içerisindeki piroplasm ya da enfekte lenfositler içindeki şizont formlarının ışık mikroskop altında teşhisi ile yapılmaktadır (Anon 1997). Hastalığı taşıyan hayvanlarda eritrositler içinde yer alan parazite ait piroplasm formlarının parazitemi azaldıkça bu hayvanların belirlenmesinde kullanılan Giemsa boyalı preparatlarda ışık mikroskopik teşhis zorlaşmakta ve bu türlü taşıyıcı durumundaki hayvanlar duyarlı olanlara hastalığın keneler yoluyla taşınmasında en önemli rolü üstlenmektedir (Neitz 1957). Aynı zamanda omurgalı konak sığırlarda *T. annulata* ile eş zamanlı olarak görülebilen *T. buffeli/orientalis* grubundaki bazı apatojenik *Theileria* türlerinin mikroskopik bakı yöntemi ile ayırımı tam olarak yapılamamaktadır.

Etkene karşı sığırların bağışıklık sistemi tarafından geliştirilen antikorların teşhisi için kullanılan IFA gibi serolojik testler (Pipano ve Cahana 1969, Anon 1997) her ne kadar hastalığın teşhisinde kullanılıyor olmasına karşın diğer *Theileria* and *Babesia* türlerine karşı gelişen ortak antikorlar serolojik testlerin özgüllüğünü sınırlamaktadır (Burrige ve ark 1974, Kiltz ve ark 1986). Aynı zamanda vücuttaki antikor seviyesi dalgalanma göstermekte (Pipano ve ark 1974) ve re enfeksiyonların olmadığı durumlarda uzun vadede taşıyıcılık yapan hayvanların vücutlarındaki antikor seviyesi teşhis edilemeyen seviyelere gerilemektedir (Kırvar ve ark 2000). Ancak, *Theileria* piroplasmaları düşük düzeylerde de olsa varlığını sürdürmektedir. Sonuç olarak, serolojik olarak negatif sonuç veren hayvanlar halen kenelere hastalığı nakledebilmektedir (Kırvar ve ark 2000).

Mikroskopik tanı yöntemi ve serolojik testlerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak ve direk olarak etkene ait DNA'nın duyarlı ve özgül olarak tespiti için geliştirilen PZR, RLB (reverse line blot) ve Loop aracılı izotermal çoğaltma (LAMP; Loop-Mediated Isothermal Amplification) gibi moleküler tanı yöntemleri son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu bölümde;

- I. *Theileria annulata* ile enfekte hasta ve taşıyıcı hayvanların duyarlı ve özgül olarak PZR yöntemi ile teşhisinde farklı gen bölgelerinin kullanılması,
- II. Aydın yöresindeki sığırlarda sık olarak rastlanan ve hayvanlarda aynı anda hastalık oluşturan *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* türlerinin eş zamanlı teşhisinde kullanılmak üzere çoklu (multipleks) PZR testinin geliştirilmesi,
- III. *Theileria annulata* DNA'sının Loop aracılı izotermal yöntemle çoğaltılması (LAMP) ve taşıyıcı hayvanların bu yöntemle teşhisi,

amaçlanmıştır. Bu doğrultuda belirtilen amaçların gerçekleştirilmesinde kullanılan yöntem, elde edilen sonuç ve tartışma yukarıda belirtilen her amaç için ayrı ayrı anlatılmıştır.

### 3.A. *Theileria annulata*'nın Hasta ve Taşıyıcı Hayvanlarda PZR yöntemi ile Teşhisi

Bu güne değin *T. annulata*'nın hem vektör kenelerde (d'Oliveira ve ark 1997b, de Kok ve ark 1993) hem de sığırlarda (d'Oliveira ve ark 1995, Gubbels ve ark 1999, Ilhan ve ark 1998, Martin-Sanchez ve ark 1999, Shayan ve ark 1998) PZR ile teşhisinde birçok farklı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerde PZR ile çoğaltılmak için kullanılan gen bölgeleri içinde 18S ssu rRNA (de Kok ve ark 1993, Ilhan ve ark 1998, Gubbels ve ark 1999, Georges ve ark 2001), merozoit/piroplazm yüzey antijenini kodlayan gen bölgesi; Tams-1 (d'Oliveira ve ark 1995, Martin-Sanchez ve ark 1999, Kırvar ve ark 2000, Altay ve ark 2008), ısı şok protein 70 (HSP70) geni (Shayan ve ark 1998) ve  $\beta$ -tubulin geni (Caccio ve ark 2000) bulunmaktadır. Tüm bu çalışmaların ortak amacı *T. annulata*'nın teşhisinde daha özgül ve duyarlı bir yöntem geliştirmek olmuştur. Bu yönden bakıldığında çoğaltmada kullanılan gen bölgelerinin özgüllüklerinin ve duyarlılıklarının önemi artmaktadır. PZR'unun performansı (verimi) reaksiyonda kullanılan ayraçların kalitesi ve aynı zamanda da çoğaltılacak olan örnekte yer alan hedef gen bölgesinin kopya sayısı ile orantılı olarak değişmektedir. Çoklu kopya sayısına sahip bölgelerin seçimi ve buna bağlı olarak PZR'unun duyarlılığının arttırılabileceği bildirilmiştir (Criado ve ark 2006). Günümüzde PZR'da yaygın olarak kullanılan 18S rRNA geninin kopya sayısı piroplasmidae ailesindeki türlerin genomunda genelde düşük sayıdadır. Örnek vermek gerekirse bu genin *Babesia bovis* genomundaki kopya sayısı 3 (Dalrymple 1990) ve *T. parva* genomundaki kopya sayısı 2'dir (Kibe ve ark 1994). *T. annulata*'nın genomunda ise 18S geninin kopya sayısı tam olarak belirlenmemekle birlikte yaklaşık 2–3 kopyaya sahip olduğu düşünülmektedir. Önceki çalışmalarda kullanılan Tams1, HSP70 ve  $\beta$ -tubulin genlerinin tümü tek kopyaya sahip gen bölgeleridir (Shayan ve ark 1998, Caccio ve ark 2000, Shiels ve ark 1989). Bugüne kadar, yeni hedef gen bölgelerinin belirlenmesi için az sayıda çalışma yapılmıştır. Bunlar arasında, *B. bovis* ve *B. bigemina* türlerinin teşhisi (Salem ve ark 1999) ile son yıllarda yapılan ve piroplasmidae ailesindeki türler arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesinde (Criado ve ark 2006) kullanılan mitokondrial sitokrom b geni bulunmaktadır.

*Theileria annulata* ile enfekte hasta veya taşıyıcı hayvanların PZR yöntemi ile tespitinde, çoğaltılacak olan hedef DNA bölgelerinin muhtemel çoklu kopyaya sahip genlerden seçilmesi testin duyarlılığını arttıracaktır. *T. annulata*'nın genomunda bulunan çoklu kopya sayısına sahip gen aileleri arasında *Sfi*, *Tar* ve SVSP genleri yer almaktadır (Pain ve ark 2005, Weir 2006). *Sfi* sub-telomerik çoklu kopyaya sahip gen ailesinde 64 gen bulunmakta ve bu ailedeki bir çok gende görevi tam olarak anlaşılamamış, sayıları 1–55

arasında değişen, yaklaşık 70 amino asitlik tekrarlı bölgelerden oluşan ve merkezi kısımlarında korunmuş aromatik bölgelere sahip 'FAINT Domain' olarak adlandırılan alanlar bulunmaktadır. *T. annulata* genomunda bulunan bir diğer çoklu kopya sayısına sahip gen ailesinde dört kromozoma dağılmış halde bulunan ve 83 paralog gen içeren *Tar* genleridir. Bu genler *T. parva* genomunda bulunan *Tpr* genlerinin *T. annulata* genomundaki ortologlarıdır ve bunlar işlevi tam olarak bilinmeyen proteinleri kodlamaktadır. Subtelomerik bölgede yer alan ve 51 paralog genden oluşan *SVSP* gen ailesinde *Theileria* özgü sub-telomerik proteinlerini kodlamaktadır (Weir 2006). Bu genlerin yanında parazitin mitokondriyal DNA'sında bulunan sitokrom b geni linear, 6.5 kb büyüklüğünde, *cyt b* proteinini kodlayan, tek kopyalı bir gendir (Hall ve ark 1990, Megson ve ark 1991). Mitokondriyal sitokrom b geni tek kopyalı bir gen olmasına karşın her mitokondrion da 2–10 mitokondriyal DNA bulunabileceği bildirilmiştir (Wiesner ve ark 1992) ve bu açıdan bakıldığında sitokrom b geni çoklu kopyalı gen olarak düşünülebilir. *T. annulata*'nın sporozoitlerinin bir mitokondrion taşıdığı bilinmektedir (Jura ve ark 1983), parazitin bunun dışındaki yaşam dönemlerindeki ne her mitokondriona düşen mitokondriyal DNA sayısı veya mitokondriya sayısı belirlenmemiştir. Yapılan bir çalışmada *T. sergenti* piroplasmlarının çok sayıda mitokondriya ihtiva ettiği gösterilmiştir (Uchida ve ark 1985). Bu genlere ek olarak, bir de *T. annulata* genomunda *T.sergenti* ve *T. buffeli* türlerinde bulunan 23 kDa piroplazm yüzey proteini (Sako ve ark 1999) benzeri olduğu kabul edilen tek kopyaya sahip, 26.8 kDa moleküler ağırlığında bir proteini kodlayan (<http://www.genedb.org/genedb/>) ve Mero I (TA13810) adı verilen bir gen bulunmaktadır (Weir 2006). Bu gen tam olarak belirlenmediysede Tams-1 genine benzer özellikler göstermektedir.

Bu kısımda *Sfi*, *Tar*, *SVSP*, mitokondriyal sitokrom b ve Mero I genlerini çoğaltacak primerler tasarlanarak özgüllükleri ve duyarlılıkları yönünden birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Gen bölgelerinden duyarlılığı ve özgüllüğü en iyi olan gen bölgesi seçilerek daha önceki çalışmalarda kullanılmış olan Tams-1 (d'Oliveira ve ark 1995, Martin-Sanchez ve ark 1999, Kırvar ve ark 2000, Altay ve ark 2008), 18S ssu rRNA (de Kok ve ark 1993, İlhan ve ark, 1998, Gubbels ve ark 1999, Georges ve ark 2001) genleri ile duyarlılıkları yönünden karşılaştırılmıştır. Daha sonra, seçilen primer çiftinin deneysel enfekte hayvanlardan elde edilen bilinen parazitemiye sahip kanın 10 katlı enfekte olmayan kanla sulandırılması ile hazırlanan seri dilüsyonlardaki tespit sınırı RLB hibridizasyon yöntemi kullanılarak 18S ssu rRNA geni ile karşılaştırılmıştır.

### **3.A.1. Gereç ve Yöntem**

#### **3.A.1.1. Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali**

Bu çalışmada, *T. annulata*'nın 12 farklı izolatu (Ankara/D7, Tunus, İnan, Sudan, Mısır, İsrail, Hindistan, Akçaova, Dalama, Pendik, Aydın, Diyarbakır), *T. parva* Kenya, *T. sergenti*, *T. lestoquardi*, *B. bovis*, *B. bigemina* ve *B. equi* olmak üzere toplam 15 *Theileria* ve üç de *Babesia* soyuna bağılı parazite ait toplam 18 DNA örneğı kullanılmıştır. Kullanılan parazit örneklarine ait detaylı bilgi Çizelge 3.A.1'de verilmiştir.

**Çizelge 3.A.1. Tezde kullanılan parazit stoklarının türü ve orijini**

Genus ve tür	Ülke	Stok orijini		Materyal	Kaynak
		Yer	ya da isim		
<i>Theileria annulata</i>	Türkiye	Ankara/D7		Kültür	Edinburg Üni., CTVM
" "	Türkiye	A.ova		Kültür	" "
" "	Türkiye	Dalama		Kültür	" "
" "	Türkiye	Pendik		Kültür	Özkoc ve Papino, 1981
" "	Türkiye	Aydın		Kültür	Edinburg Üni., CTVM
" "	Türkiye	Diyarbakır		Kültür	Weir, 2006
" "	Tunus	JED-4		Kültür	Ben Miled ve ark.1994
" "	İran	Razi-S3		Kültür	Hooshmand-Rad ve Hashemi-Fesharki, 1968
" "	Sudan	Umbaneai		Kültür	Shiels ve ark. 1986
" "	Mısır	Gharb		Kültür	Ouhelli ve ark.1989
" "	İsrail	Tova		Kültür	Pipano, 1974
" "	Hindistan	Ode		Kültür	Baylis ve ark.1992
<i>Theileria parva</i>	Kenya	Muguga		Kültür	Oura ve ark. 2003
<i>Theileria sergenti</i>	Japonya	unknown		Kültür	Katzer ve ark.1998
<i>Theileria lestoquardi</i>	İran	Lahr		Kültür	Kıvrar ve ark.1998
<i>Babesia bovis</i>	Meksiko	Meksiko		Kültür	Erp ve ark. 1978; Smith ve ark. 1978
" "	Meksiko	Kusanwyanga		Kültür	Taylor ve McHardy 1979
" "	Meksiko	M07		Kültür	Vega ve ark. 1985
" "	Avustralya	Lismore		Kültür	Kahl ve ark. 1982
" "	İsrail	Galed saha suşu		Kültür	Kimron Vet. Inst., İsrail
" "	İsrail	Gonen saha suşu		Kültür	" "
" "	İsrail	MH aşı suşu		Kültür	" "
" "	İsrail	T aşı suşu		Kültür	" "
" "	Türkiye	Aydın		Kültür	ADÜ.Veteriner Fak. Parazitol. AD.
<i>Babesia bigemina</i>	Kenya	Muguga		Kültür	Posnett ve ark. 1998
<i>Theileria equi</i>	Bilinmiyor	Bilinmiyor		Kültür	Bilinmiyor
<i>A. marginale</i>	Türkiye	Aydın		Kan	ADÜ.Veteriner Fak. Parazitol. AD.
" "	Bilinmiyor	Bilinmiyor		Bilinmiyor	Bilinmiyor
" "	Bilinmiyor	St. Maries		Bilinmiyor	" "
<i>A. centrale</i>	Türkiye	Aydın		Blood	ADÜ.Veteriner Fak. Parazitol. AD.
<i>A. phagocytophila</i>	Bilinmiyor	Bilinmiyor		Kültür	Bilinmiyor
<b>Enfekte olamayan sığır PBM</b>	Türkiye	Aydın		Kan	ADÜ.Veteriner Fak. Parazitol. AD.

### 3.A.1.2. Deneysel enfeksiyon

Bilinen parazitemiye sahip enfekte kan örneğinin, enfekte olmayan hayvana ait kan örneği kullanılarak on katlı sulandırılmalarının yapılması ve bu sulandırmaların her birinden hazırlanan DNA örneklerinin PZR'un duyarlılığının belirlenmesinde kullanılması amacıyla altışar aylık, iki adet erkek holştayn buzağında deneysel enfeksiyon oluşturulmuştur. Kısaca; buzağılardan biri (Buzağı I) mililitresinde  $2 \times 10^6$  hücre bulunan *T. annulata* Ankara 273 (pasaj 5) makroşizont hücre kültürü kullanılarak deri altı yolla enfekte edilmiş, diğer buzağı (Buzağı II) ise herhangi bir enfeksiyon oluşturulmaksızın kontrol olarak tutulmuştur. Buzağı I'de günlük olarak rektal vücut ısısı ölçümü yapılmış, ayrıca enfeksiyon oluşturulan taraftaki şişkin lenf yumrusundan hazırlanan biopsi örneklerinden ve jugular venden alınan kan örneklerinden hazırlanan preparatlar Giemsa ile boyanarak sırası ile parazite ait şizont ve piroplazm formları yönünden incelenmiştir. Jugular venden hazırlanarak Giemsa ile boyanan preparatlarda mikroskopik bakı ile eritrositler içinde tespit edilen piroplazm formlarının sayımı yapılmış (1000 adet eritrosit sayılarak bunlarda enfekte eritrosit yüzdesi belirlenmiştir) ve enfekte hayvan kanındaki piroplazm sayısı %1'e ulaştığında EDTA vakumlu tüpe alınan kan, kontrol buzağı (Buzağı II) kanı içinde %0.1 parazitemiden başlayarak  $10^{-10}$  parazitemiye kadar 10 katlı sulandırılmıştır. Her bir sulandırmadan alınan 100 mikrolitre ( $\mu$ l) kandan Wizard Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti (Promega™) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmış ve hazırlanan DNA örnekleri 35'er  $\mu$ l rehidrasyon solüsyonu kullanılarak rehidre edilerek +4°C'da saklanmıştır. Aynı zamanda buzağı II'den alınan enfekte olmayan kan örneğinden yukarıda belirtildiği şekilde DNA örneği hazırlanarak negatif kontrol olarak +4°C'da saklanmıştır. Ayrıca  $0.1-10^{-10}$  parazitemiye kadar olan her sulandırma basamağından alınan 100 mikrolitre kan örneği PZR testi ile duyarlılığın belirlenmesi amacıyla FTA kartları (Whatman Bioscience, İngiltere) üzerine dairesel şekilde damlatılmış ve ve kurutulan örnekler oda ısısında PZR'da kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

Her FTA kartından delici (Harris micro – punch™, Whatmann Biosciences, İngiltere) kullanılarak kesilen 2 mm çapındaki disk şeklindeki örnekler PZR tüpü içine konulmuştur. PZR tüpü içindeki örnekler üç kez FTA purifikasyon solüsyonu ile ve iki kezde 10 mM Tris–HCl (pH 8): 0.1 mM EDTA (pH 8, TE) solüsyonu ile belirtildiği şekilde yıkanmış (Whatman FTA single punch purification for PCR protocol, Whatman Bioscience, İngiltere) ve her bir disk ayrı ayrı PZR tüplerine konularak aşağıda anlatıldığı şekilde PZR'unda çoğaltılmak üzere kullanılmıştır.

### 3.A.1.3. *Sfi*, *Tar*, *SVSP*, Sitokrom b ve MeroI Genlerinin PZR ile Çoğaltılmasında Kullanılmak Amacıyla Primerlerin Tasarlanması

*Sfi*, *Tar*, *SVSP* ve sitokrom b genlerini çoğaltmada kullanılacak primerlerin tasarlanması için Clustal X (1.83) bilgisayar programı kullanılmıştır (Thompson ve ark 1997). Bu amaçla, *Sfi*, *Tar* ve *SVSP* gen ailelerinde bulunan genler her ailedeki genler kendi aralarında olacak şekilde clustal X (1.83) bilgisayar programı ile karşılaştırılmıştır. İlgili gen ailesinde bulunan ve kendi içlerinde korunmuş olan bölgelere sahip alanlar belirlenerek buralara özgü primerler tasarlanmıştır. *T. annulata* mitokondriyal sitokrom b geni yukarıda bahsedilen genlerden farklı olarak tek kopyalı bir gen olup diğer *Theileria* ve *Babesia* türlerinde de aynı gen bölgesi bulunmaktadır. Bu nedenle *T. annulata*'ya ait sitokrom b geninin özgül olarak çoğaltılabilmesi için diğer türlere ait sitokrom b geni ile karşılaştırılarak sadece *T. annulata*'ya özgü olan bölgeler belirlenmeli ve bu bölgelere özgü primerler tasarlanmalıdır. Bu amaçla *T. annulata* (XM949625.1), *T. parva* (XM949625.1), *Babesia bovis* (EU075182.1) ve *B. bigemina* (AF109354.1) türlerine ait sitokrom b genleri clustal X bilgisayar programı kullanılarak kendi aralarında karşılaştırılmış ve sitokrom b genini çoğaltmada kullanılacak primer bölgeleri *T. annulata* ile diğer *Theileria* ve *Babesia* türleri arasında farklılık gösteren kısımlardan seçilmiştir. MeroI genini çoğaltmada kullanılacak primerlerin seçiminde ilk olarak farklı bölgelerden elde edilen izolatlara ait MeroI geninin dizilimleri (Weir 2006) karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucu farklı izolatlar arasındaki gen dizilimlerinde farklılık göstermeyen bölge belirlenerek burayı çoğaltacak primer çifti tasarlanmıştır. Yukarıda bahsedilen primer çiftlerine ek olarak *T. annulata*'nın PZR ile teşhisinde daha önceki çalışmalarda kullanılan ve Tams-1 genini çoğaltan N516/N517 (d'Oliveira ve ark 1995) ile ssu rRNA genini çoğaltan 989–1347 (Ilhan ve ark 1998) primer çiftleri bu çalışmada tasarlanan primerlerin duyarlılıkları ile karşılaştırılmak amacıyla kullanılmıştır (Çizelge 3.A.3).

### 3.A.1.4. PZR ile Tasarlanan Primerlerin Değerlendirilmesi

Her gen bölgesi için tasarlanan primer çiftleri ilk olarak özgüllükleri yönünden farklı *T.annulata* izolatları (Tunus, İran, Sudan, Mısır, Hindistan, İsrayil, Ankara/D7, Aydın Diyarbakır, A.ova, Dalama, Pendik), *T. parva* ve BL20 kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla uygulanan PZR'da 50 µl'lik son hacimde, 45 mM Tris-HCl, pH 8.8, 11 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.113 mg / ml BSA, 4.4 µM EDTA, herbir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'tan 1 mM, 1 U Ampli *Taq* DNA polimeraz (Applied Biosystems), 10 µM ileri ve geri yönlü primer çifti ile 2 µl DNA örneği kullanılmıştır. Reaksiyon Techne TC-512 marka



otomatik termal sikluslu makinede gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 94°C'de 3 dakikalık ön denaturasyonu takiben, her siklus denaturasyon (95°C'de 50 saniye), bağlanma (50°C'de 50 saniye) ve uzama (72°C'de 1 dakika) aşamalarından oluşmak üzere 30 siklus ve 72°C'de 10 dakikalık son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri 4°C'de tutulmuştur. Daha sonra her PZR ürününden 10 µl olmak koşuluyla mililitresinde 10 µl ethidiyum bromid bulunan %1,5'lik agaroz jelde 100 voltluk akımda bir saat elektroforeze tabi tutulmuş ve son olarak ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir. Seçilen primer çiftlerine en uygun bağlanma ısılarının belirlenmesi amacıyla derece derece değişen (gradient) PZR'u uygulanmıştır. Dereceli PZR'u her siklusun bağlanma ısısında 55°C'de 10°C'lik derecelendirme yapılmak kaydıyla yukarıda belirtilen şekilde yapılmış ve değerlendirilmiştir. En uygun bağlanma ısıları belirlendikten sonra seçilen primer çiftleri duyarlılıkları yönünden kendi aralarında karşılaştırılarak duyarlılığı en yüksek olan primer çifti sonraki aşamalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Duyarlılıkları yönünden değerlendirilirken uygulanan PZR'da yukarıda belirtilenden farklı olarak 50 µl'lik son hacimde 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, %0.001 gelatin, her deoksiribonükleikasitten 250 µM, 1 U Ampli *Taq* DNA polimeraz (Applied Biosystems), 10 µM ileri ve geri yönlü primer çifti ile 2 µl DNA örneği olacak şekilde kullanılmıştır. Görüntüleme yukarıda anlatıldığı şekilde yapılmıştır. En son olarak seçilen primer çiftinin duyarlılığı Tams-1 ve 18S ssu rRNA geni ile aynı örnekler kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Son olarak, seçilen primer çiftinin duyarlılığı RLB hibridizasyonu yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar 18S RLB hibridizasyonu ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

### **3.A.1.5. RLB hibridizasyonu ve duyarlılığın belirlenmesi**

Sitokrom b PZR'unun duyarlılığının belirlenmesi ve bunun 18S PZR'u ile karşılaştırılması amacıyla RLB hibridizasyon testi daha önceki çalışmalarda belirtilen şekilde yapılmıştır (Gubbels ve ark 1999, Georges ve ark 2001). *T. annulata*'nın 18S ssu rRNA genindeki V4 değişken bölgesini çoğaltmak için RLB-F ve RLB-R primer çifti (Çizelge 3.A.2) kullanılmıştır. Çizelge 3.A.2'de belirtilen oligonükleotid probalar, çoğaltılan PZR ürünlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu amaçla 18S PZR ürünlerinin belirlenmesinde daha önceki çalışmalarda belirtilen *Theileria/Babesia* catchall, *T. annulata*, *T. buffeli/orientalis* grubu, *Babesia bovis* ve *B. bigemina* türlerine özgü probalar (Gubbels ve ark 1999, Georges ve ark 2001) kullanılmış ve RLB hibridizasyonu daha önceki çalışmalarda belirtildiği şekilde yapılmıştır (Gubbels ve ark 1999, Georges ve ark 2001). Sitokrom b genini çoğaltmada kullanılan cyto b1 primer çiftlerinden geri yönlü primerinin 5' kısmı biotin ile

işaretlenmiş (Çizelge 3.A.2) ve çoğaltılan PZR ürünlerinin belirlenmesinde kullanılan oligonükleotid prob bu çalışmada tasarlanmıştır (Çizelge 3.A.2 ve Şekil 3.A.1). RLB, hibridizasyon sonrası yapılan yıkama aşamasındaki değişiklik (56°C'da 15 dakika) haricinde 18S için uygulanan koşullarla aynı şekilde yapılmıştır. Kullanılan tüm problarda membrana bağlanmayı sağlayan ve N ucunda bulunan N-(trifluoracetamidohexyl-cyanoethyl, N, N-diisopropyl phosphoamidite [TFA]-C<sub>6</sub> amino bağlayıcılar yer almaktadır.

RLB hibridizasyonunda kısaca; Çizelge 3.A.2'de belirtilen oranlarda sulandırılan ilgili oligonükleotidler miniblotter yardımı ile membrana yüklenmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek oligonükleotidlerin N terminal uçlarında yer alan amino bağlayıcılar aracılığıyla membrana kovalent olarak bağlanmaları sağlanmıştır. Süre sonunda oligonükleotidler pipetle membrandan aspire edilmiş ve membran 100 ml 100 mM NaOH ile 10 dakika oda sıcaklığında inaktive edilmiştir. Daha sonra membran 100 ml 2xSSPE (20x SSPE: 360 mM NaCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 2 mM EDTA, pH 7.4) / %0.1 SDS ile 60°C'de 5 dakika boyunca yıkanmıştır. En son aşamada membran üzerine 20 mM EDTA eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında yıkanmış ve bu süre sonunda membran üzerine bir miktar taze 20 mM EDTA konularak membran kullanım aşamasına kadar +4°C'de saklanmıştır. Yukarıda anlatılan yöntemle hazırlanan iki membrandan birincisi (Membran I) cyto b1 PZR ile çoğaltılan sitokrom b genine ait 312 bp'lık bölgeye bağlanacak şekilde tasarlanmış cyto b1 probu ile hazırlanırken, diğer membran (Membran II) ise RLB-F ve RLB-R primer çiftleri kullanılarak PZR yoluyla çoğaltılan 18S ssu rRNA genine ait V4 değişken bölgesinde her türe özgü belli bölgelere bağlanacak şekilde tasarlanmış problar (*Theileria/Babesia* catchall, *T. annulata*, *T. buffeli/orientalis* grup, *B. bovis* ve *B. bigemina*) kullanılarak hazırlanmıştır. Çoğaltılan PZR ürünlerinden 10µl alınarak 150 µl 2xSSPE/%0.1 SDS ile sulandırılmış ve çift zincirli yapıların denatüre olması için 100°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Denatüre olan ürünler hemen buz üzerine alınarak membranlara yüklenene kadar burada bekletilmişlerdir. Bu esnada ilgili membranlar +4°C'den alınarak 100 mL 2xSSPE/%0.1 SDS ile oda sıcaklığında 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Buz üzerinde bekletilen denatüre PZR ürünleri, daha önceden anlatıldığı şekilde kovalent olarak membranlara bağlanmış olan oligonükleotidlerle 90° açı oluşturacak şekilde miniblotter yardımı ile membrana yüklenerek PZR ile çoğaltılan ürünlerin özgül oldukları ilgili oligonükleotid problara bağlanmaları için 42°C'deki etüvde bir saat hibridizasyona bırakılmıştır. Bir saat sonunda membran üzerindeki PZR ürünleri pipetle aspire edilmiş ve membran miniblotterden alınarak daha önceden 50°C'de bekletilerek ısıtılmış 100 ml 2xSSPE/%0.5 SDS içeren solüsyon ile membrana hibridize olmamış ürünlerin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla 10'ar dakika boyunca iki kez 50°C'lik

hibridizasyon fırınında yıkanmıştır. Bunu takiben, membrandaki problara hibridize olmuş PZR ürünlerinin belirlenmesi amacıyla içerisinde oluşan PZR ürünlerinin 5' ucunda bulunan biotin'e bağlanma özelliği gösteren peroksidaz ile işaretli streptavidin konjugat (Boehringer, Mannheim, Almanya) bulunan 42°C'ye ısıtılmış 10 ml 2x SSPE/%0.5 SDS (10 ml 2xSSPE/%0.5 SDS+2.5 µl peroksidaz ile işaretli streptavidin konjugat) bulunan solüsyon ile 30 dakika boyunca 42°C'de inkube edilmiştir. Daha sonra konjugat dökülerek membran 100 ml 2xSSPE/%0.5 SDS ile 42°C'de 10 dakika boyunca iki kez yıkanmıştır. Yıkamalar sonrasında membran oda sıcaklığında 100 ml 2xSSPE ile iki kez beşer dakikalık sürelerde yıkanmış ve süre sonunda 2xSSPE dökülerek membran 10 ml ECL tespit sıvısında (Amersham, İngiltere) bir dakika inkube edilmiştir. Sonra membran iki asetat kağıdı arasına konarak hazırlanan film kaseti içerisine yerleştirilmiş ve 10 dakika boyunca membranda oluşan ışımının film kasetine geçmesi için beklendikten sonra röntgen odasında filmin banyosu yapılmıştır. Banyo sonunda oluşan ışımalar incelenerek cytob1 ve 18S PZR'larının bilinen parazitemideki dilüsyonlarda duyarlılıkları belirlenmiştir.

Daha sonra membran tekrar kullanıma hazır hale getirilmek için 80°C'de 30'ar dakika boyunca 100 ml %1 SDS ile iki kez yıkanmış ve son olarakta oda sıcaklığında 15 dakika bir kez 20 mM EDTA ile yıkandıktan sonra üzerine az miktarda 20mM EDTA eklenerek +4°C'de saklanmıştır.

**Çizelge 3.A.2.** Cyto b1 ve RLB F2/RLB R2 primer çiftleri kullanılarak çoğaltılan sitokrom b ve 18S su rRNA genlerinin elirlenmesinde kullanılan oligonükleotid proplar.

Prob isimleri*	Oligonükleotid prob Dizilimleri <sup>a</sup>	Kons. (pmol)	Pozisyon <sup>b</sup>	Özgüllük	Kaynak
Cytob1	CTGGGGAGCTACAGTCATAGGTGG	150	379–413 <sup>d</sup> 225–248 <sup>e</sup>	<i>T.annulata</i> 'ya özgü	Bu tez
<i>Theileria/Babesia catchall</i> <sup>c</sup>	TAATGGTTAATAGGARCRGTTG	50	Değişken	<i>Theileria</i> and <i>Babesia</i> spp. özgü	Gubbels ve ark. (1999)
<i>T.annulata</i>	CCTCTGGGGTCTGTGCA	100	662–682	<i>T.annulata</i> 'ya özgü	Georges ve ark.(2001)
<i>Theileria buffeli/orientalis</i> <sup>c</sup>	GGCTTATTTTCGG(A/T)TTGATTTT	150	Değişken	<i>Theileria buffeli/orientalis</i> türlerine özgü	Gubbels ve ark. (1999)
<i>Babesia bovis</i> <sup>c</sup>	CAGGTTTCGCCTGTATAATTGAG	100	Değişken	<i>Babesia bovis</i> 'e özgü	Georges ve ark. (2001)
<i>Babesia bigemina</i> <sup>c</sup>	CGTTTTTTCCTTTTGTGG	200	Değişken	<i>Babesia bigemina</i> 'ya özgü	Gubbels ve ark. (1999)

(<sup>a</sup>); Dizilimin 5'-3' yönü yazılıdır.

(<sup>b</sup>); Dizilim içindeki pozisyon her primer için 5'-3' yönünde verilmiştir.

(<sup>c</sup>); Gubbels ve ark (1999) ile Georges ve ark (2001) tarafından daha önceki çalışmalarda kullanılmış proplardır ve 'R' harfi ile gösterilen yerler A ya da G bazlarından birini belirtir.

(<sup>d</sup>) ve (<sup>e</sup>); Şekil 3.A.1'de belirtilen pozisyonları ifade etmektedir.

(\*); Tüm oligonükleotid proplarda 5' yönünde C6 amino bağlayıcılar vardır

### 3.A.1.6. Seçilen Primer Çiftleri Kullanılarak Çoğaltılan PZR Ürünlerinin Sekans Analizleri İçin Klonlanması

Yedi farklı *T. annulata* (Tunus, Akçaova, Dalama, Pendik, Aydın, Diyarbakır ve Ankara/D7) izolatı ile *cyto1* primer çifti kullanılarak çoğaltılan PZR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde yukarıda belirtildiği şekilde elektroforeze tabi tutularak, ultraviyole ışık altında görüntülenmiş ve 312 bp'lık ürünler jelden kesilerek ayrılarak Qiagen Gel purifikasyon kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılarak purifiye edilmişlerdir. Bu amaçla jelden kesilerek alınan bantlar tartılarak gramajları belirlenmiş ve belirlenen ağırlığın üç katı kadar QG solüsyonu eklenerek (Örneğin; 10 miligram gel ağırlığına 30 mikrolitre QG solüsyonu eklenerek 50 °C'de 10 dakika boyunca inkübe edilerek jelin erimesi sağlanmıştır. Daha sonra erimiş jeli içeren sıvı pipetle alınarak içinde jelden ayrılan DNA'nın bağlanmasını sağlayan kolonlar (QIAquick spin column) bulunan 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine konularak bir dakika boyunca santrifüj edilmiş ve jelden ayrılan DNA'nın koloma bağlanması sağlanmıştır. Bunu takiben koloma bağlı olan DNA 500 µl QG solüsyonu eklenerek yukarıda belirtilen santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra 750 µl PE solüsyonu eklenerek bir dakika santrifüj edilmiş, bunu takiben bir dakikalık ikinci santrifüj işlemi uygulanarak kolona bağlı kalabilme ihtimali olan solüsyon artıklarından arındırılmıştır. Son aşamada kolona bağlı DNA'nın elüye edilebilmesi için 50 µl Elüsyon solüsyonu (TE; Tris-EDTA, pH 7) eklenerek bir dakika boyunca oda ısısında bekletilmiş ve bunu takiben kolum temiz 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne konulmuş ve bir dakika boyunca santrifüj edilerek purifiye edilen DNA'nın tüpe elüsyonu sağlanmıştır. Jelden kesilerek ayrılan ve purifiye edilen PZR ürünleri sekan analizi için TOPO TA Klonlama Kiti (Invitrogen™) kullanılarak pCR4-TOPO plasmid vektörü (Invitrogen™) içine klonlanmıştır. Bu amaçla, temiz bir mikrosantrifüj tüpü içine dört µl purifiye edilmiş PZR ürünü, bir µl tuz solüsyonu ve bir µl pCR4-TOPO plasmid vektör eklenerek oda ısısında (22-23°C'de) beş dakika inkübe edilerek PZR ürününün vektör içine topoisomeras I enziminin tirozil kısmı (Tyr-274) yardımı ile klonlanması sağlanmıştır ve vektöre klonlanan ürün Transforming One Shot® TOP10 kimyasal olarak yeterli hale getirilmiş *E. coli* hücreleri (Invitrogen™) içine transforme edilmiştir. Bu amaçla, *E. coli* hücreleri -80°C'den buz üstüne alınarak eritilmiş ve üzerine iki µl klonlama reaksiyonundan elde edilen ürün eklenerek parmakla hafifçe vurularak karışması sağlanmıştır (pipetleme yapılmadan). Daha sonra 30 dakika boyunca buz üzerinde bekletilen ürünlere 42°C'lik su banyosu içinde 30 saniye boyunca sıcak şoku uygulanarak *E. coli* hücrelerinin yüzey geçirgenliği artırılarak vektörün hücre içine girişi sağlanmıştır. Sıcak şokunu takiben hücrelerin üzerine 250 µl S.O.C

medyumu (%2 Tripton, %0.5 Maya Ekstarktı, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukoz) eklenerek 37°C'lik çalkalamalı inkübatör içinde 200 rpm de, bir saat boyunca tüpler yatay konumda olacak şekilde inkübe edildikten sonra daha önceden hazırlanan ve içerisinde 100 µg/ml ampisilin bulunan LB agar (LB agar; 1 litresinde 100 mg NaCl, %10 Triptone, %5 Maya ekstraktı, %10 agar bulunan solüsyon) üzerine 20 ve 50 µl olacak şekilde ekilerek gece boyu kolonilerin üremesi için 37°C'de bekletilmiştir. Ertesi gün üreyen kolonilerden seçilerek içerisinde 100 µg/ml ampisilin bulunan LB medyum (LB medyum; 1 litresinde 100 mg NaCl, %10 Triptone, %5 Maya ekstraktı bulunan solüsyon) içinde 37°C'de çalkalamalı inkübatörde bir gece çoğalmaya bırakılmıştır. Ertesi günü medyum içinde üreyen kolonilerden QIAGEN Plazmid DNA Ekstraksiyon Kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılarak içinde PZR ile çoğaltılan gen bölgesi bulunan plazmidlerin pürifikasyonu yapılmıştır. Kısaca, 10 mL medyum +4°C'de, 8000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüj edilerek *E. coli* hücreleri dipte toplanmıştır. Bu hücreler 250 µl P1 solüsyonu kullanarak tekrar sulandırılarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne konulmuş, daha sonra bu sulandırmanın üstüne 250 µl P2 solüsyonu eklenerek iyice karışması sağlanmıştır. Bu karışımın üstüne 350 µl N3 solüsyonu eklenerek iyice karışmaları sağlandıktan sonra 13000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan kısım dikkatlice alınarak içerisinde DNA'nın bağlanmasını sağlayan kolonlara (QIAprep spin column) konularak 30–60 saniye boyunca santrifüj edilmiş ve dipte toplanan sıvı döküldükten sonra koluma 0.5 ml PB solüsyonu eklendikten sonra 30–60 saniye santrifüj edilerek yıkanması sağlanmıştır. Daha sonra 0.75 ml PE solüsyonu eklenip 30–60 saniye santrifüj edilerek bir kez daha yıkanmıştır. Dipte toplanan sıvı döküldükten sonra kolumda kalmış olan tüm yıkama solüsyonunun giderilmesi için bir dakika daha santrifüj edilmiştir. Son aşamada koluma bağlı DNA'nın elüye edilebilmesi için 50 µl Elüsyon solüsyonu eklenerek bir dakika boyunca oda ısısında bekletilmiş ve bunu takiben kolon temiz 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne konulmuş ve bir dakika boyunca santrifüj edilerek purifiye edilen DNA'nın tüpe elüsyonu sağlanmıştır. Elüye olan plasmid DNA'nın 1 µg'ı EcoR1 restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jelde (yukarıda anlatıldığı şekilde) elektroforeze tabi tutulmuş ve kesilen ürünlerin boylarına bakılarak PZR ürününün vektör içerisinde klonlanıp klonlanmadığı doğrulandıktan sonra sonra plazmid DNA örnekleri (1–2 µg) 37°C'de bir gece boyunca kapakları açık olarak bekletilerek DNA'nın kurumması sağlanmış ve bu örnekler sekans analizlerinin yapılması için ticari bir şirkete gönderilmiştir (MWG Biotech, Almanya).

**Çizelge 3.A.3.** PZR’da kullanılmak üzere tasarlanan primer çiftleri.

Gen adı (kopya sayısı/genom)	Primer ismi	Dizilim <sup>a</sup>	Çoğaltılan bölgenin uzunluğu (bp)	Primerin Özgüllüğü
<i>Sfi</i> gen ailesi (64 kopya/genom)	<b>sfiset1</b>	F <sup>c</sup> ; GGTGAGAC*(G/T)AGGACTTTCAC R <sup>c</sup> ; ACACCATAGAC*(C/A)GTGACC	182	<i>T.annulata</i> ’ya özgü
" "	<b>sfiset2</b>	F; GGTCAC*(T/G)GTCTATGGTGT R; TAGGATTGAAATGACCGAAG	195	<i>T.annulata</i> ’ya özgü
" "	<b>sfiset3</b>	F; AAGGCAGTACTGATGGGTTT R; CT*(A/T)GACTCGAATATTATTGG	227	<i>T.annulata</i> ’ya özgü
" "	<b>sfiset4</b>	F; CCAATAATATTCGAGTC*(A/T)AG R; GATTTGTGACACTGAACTGGT	174	<i>T.annulata</i> ’ya özgü
<i>Tar</i> gen ailesi (90 kopya/genom)	<b>TarA1</b>	F; CTATGATGCT*(C/T)AA*(C/T)ATTAG R; CACCAGAGTTCCA*(A/G)*(T/A)GCACT	124	<i>T.annulata</i> ’ya özgü
" "	<b>TarB1</b>	F; TCTGGATTTGT*(G/A)TTTGGTA R; ATTTCTCC*(G/T)ATTACCAA	151	<i>T.annulata</i> ’ya özgü
" "	<b>TarC1</b>	F; TGGT*(A/C)ATTGTTGGTATGGG R; GCTA*(C/T)TAT*(G/T)ACTGGTGGAA	136	<i>T.annulata</i> ’ya özgü
" "	<b>TarD1</b>	F; TCACTTCA*(T/C)TA*(T/C)AGAGA*(T/C)TC R; TTATATTCTAT*(A/T)ATGTA*(A/T)CC	238	<i>T.annulata</i> ’ya özgü
" "	<b>TarE1</b>	F; CCTGGTATGATTGTACCATT R; GA*(A/G)TCTCT*(A/G)TA*(A/G)TGAAGTGA	378	<i>T.annulata</i> ’ya özgü
Sitokrom b (1 kopya/genom)	<b>Cytob1</b>	F; ACTTTGGCCGTAATGTTAAAC R; CTCTGGACCAACTGTTTGG R <sup>b</sup> ; 5’-biotin-CTCTGGACCAACTGTTTGG	312	<i>T.annulata</i> ’ya özgü
" "	<b>Cytob2</b>	F; CTCTGGACCAACTGTTTGG R; CCAGATTGCACTCCAATT	232	<i>T.annulata</i> ’ya özgü
18S ssu rRNA (bilinmiyor)	<b>RLB</b>	F; GACACAGGGAGGTAGTGACAAG R; 5’-biotin-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT		Tüm <i>Theileria</i> ve <i>Babesia spp.</i> trlerine özgü
MeroI (TA13810) (1 kopya/genom)	<b>MeroI</b>	F; GCTCCTTTCTTCATCAAGATG R; GAGATGCAACAACAACGAAG	334	<i>T.annulata</i> ’ya özgü
30 kDa merozoit yüzey antijen geni Tams-1 (1 kopya/genom)	<b>N516/N517<sup>d</sup></b>	F; GTAACCTTTAAAAACGT R; GTTACGAACATGGGTTT	721	<i>T.annulata</i> ’ya özgü
ssu rRNA (bilinmiyor)	<b>989-1347<sup>e</sup></b>	F; AGTTTCTGACCTATCAG R; TGCACAGACCCAGAGG	372	<i>T.annulata</i> ’ya özgü

(<sup>a</sup>); Dizilimin 5’-3’ yönü yazılıdır.

(<sup>\*</sup>); İşareti ile gösterilen bölgelerde ilgili primerin o pozisyonuna parantez içinde yazılan baz çiftlerinden biri gelecek şekilde tasarlanmıştır.

(<sup>b</sup>); RLB hibridizasyonunda kullanılan ve *T. annulata*’ya ait sitokrom b geninin geri yönlü çoğaltan primer.

(<sup>c</sup>); ‘F’ ve ‘R’ harfleri sırası ile ileri ve geri yönlü primerleri belirtmek için kullanılmıştır.

(<sup>d</sup> ve <sup>e</sup>); Sırasıyla d’Oliveira ve ark (1995) ve Allsopp ve ark (1993) tarafından kullanılan primer çiftlerini belirtmektedir.

**Çizelge 3.A.4.** Farklı bölgelere ait *T. annulata* izolatları ile bazı *Theileria* ve *Babesia* türlerine ait DNA örnekleri kullanılarak *Sfi*, *Tar*, sitokrom b ve Mero I primer çiftlerinin özgülüğünün belirlenmesi amacıyla yapılan PZR sonuçları

Primer çiftleri	Kullanılan DNA örnekleri															Su				
	<i>T.a.</i> Tunus	<i>T.a.</i> Razi S3	<i>T.a.</i> Umbaneai	<i>T.a.</i> Gharb	<i>T.a.</i> Ode	<i>T.a.</i> Tova	<i>T.a.</i> Aydın	<i>T.a.</i> Diyarbakır	<i>T.a.</i> A.ova	<i>T.a.</i> Dalama	<i>T.a.</i> Pendik	<i>T.a.</i> Ank/D7	BL20 <sup>b</sup>	<i>T.</i> parva	<i>T.</i> sergenti		<i>T.</i> lestoquardi	<i>B.</i> bovis	<i>B.</i> bigemina	<i>T.</i> equi
<i>Sfi</i> set1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sfi</i> set2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sfi</i> set3	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sfi</i> set4*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tar</i> A1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tar</i> B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tar</i> C1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tar</i> D1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tar</i> E1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cytob1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Cytob2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MeroI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-

(\*); PZR ile elde edilen ürünlerinin agaroz gel elektroforezinde çok zayıf bantlar elde edildiği belirtir.

(<sup>a</sup>); MeroI primer çifti ile çapraz reaksiyon veren *T. lestoquardi* türü.

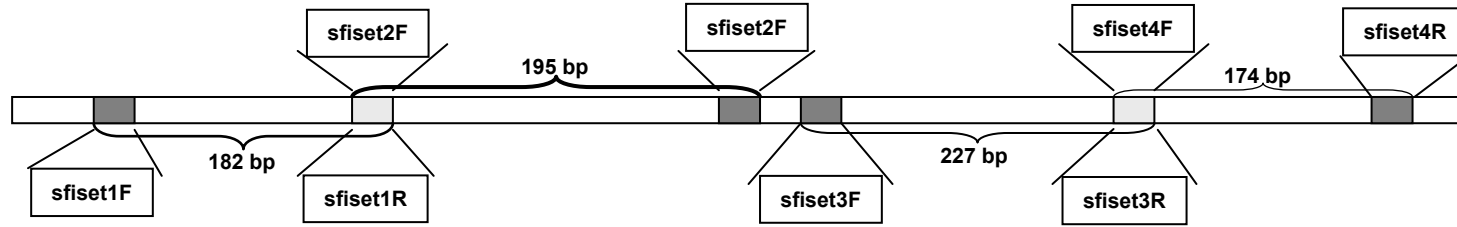
(<sup>b</sup>); Enfekte olmayan sığır hücre kültüründen hazırlanan DNA örneği.



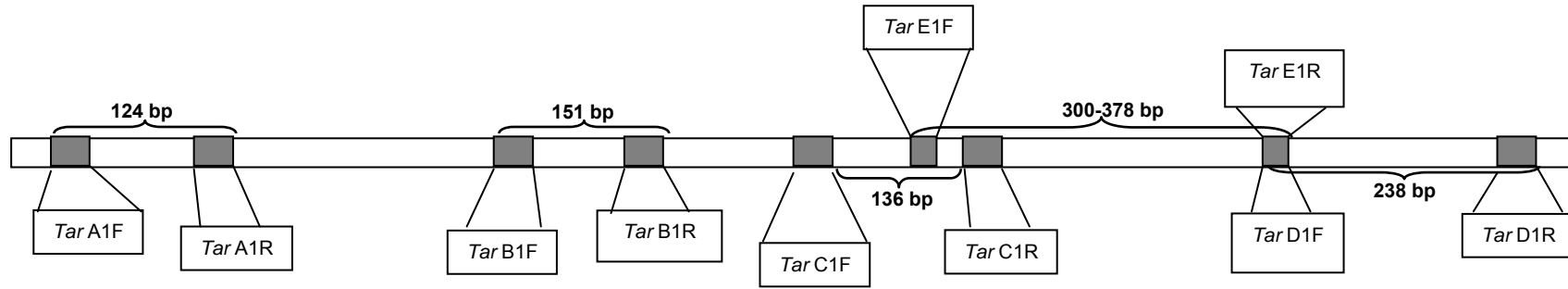
### 3.A.2. Bulgular

#### 3.A.2.1. *Sfi*, *Tar*, *SVSP*, *Sitokrom b* ve *MeroI* Genlerinin PZR ile Çoğaltılmasında Kullanılmak Amacıyla Tasarlanan Primerler ve PZR'u ile Özgüllüklerinin Belirlenmesi

*Sfi*, *Tar*, *sitokrom b* ve *MeroI* genlerini çoğaltmada kullanılacak primer çiftlerinin tasarlanmasında clustal X (1.83) bilgisayar programı kullanılmıştır. Bu amaçla, *Sfi* gen ailesine ait 64 gen biribiri ile karşılaştırılması sonucunda ailedeki genlerin birbirleri arasında oldukça farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Primerlerin tasarlanabilmesi için ortak korunmuş bir bölge ancak ailedeki 8 gen arasında bulunabilmiştir ve 8 gende ortak olan korunmuş bölgeleri çoğaltmak amacıyla *Sfi* set1, *Sfi* set2, *Sfi* set3 ve *Sfi* set4 olmak üzere dört primer çifti tasarlanmıştır (Çizelge 3.A.3). Bu primer çiftlerinden *Sfi* set 1 geri yönlü ve *Sfi* set 2 ileri yönlü primerleri ile *Sfi* set 3 geri yönlü ve *Sfi* set 4 ileri yönlü primerleri aynı bölgeden tasarlanmış olup, birbirinin ters yönlü komplementelerleridir (Şekil 3.A.1). *Sfi* set 1, set 2, set 3 ve set 4 primer çiftleri kullanarak gen üzerinde sırası ile 182, 195, 227 ve 174 bp uzunluğundaki bölgeler çoğaltılmıştır. Primer çiftlerinin 5'-3' yönlü nükleotid dizimleri Çizelge 3.A.3'de belirtildiği şekildedir. *Sfi* set 3 ve *Sfi* set 4 primer çiftlerinin genler üzerinde çoğalttığı bölgelerin uzunlukları arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiş (Resim 3.A.1), buna karşın *Sfi* set1 ve *Sfi* set2 primer çiftlerinin çoğalttığı bölge gen ailesindeki bazı genlerde uzunluk farklılığı göstermiştir (Resim 3.A.1 ve 3.A.2). *Sfi* set1, set2, set3 ve set4 primer çiftlerinin özgüllüğünün belirlenmesi amacıyla farklı *T. annulata* izolatları (Tunus, İran, Sudan, Mısır, Hindistan, İsrail, Ankara/D7, Aydın, Diyarbakır, A.ova, Dalama, Pendik), *T. parva* ile BL20 kullanılarak yapılan PZR sonuçları Çizelge 3.A.4'de verilmiştir. Buna göre *Sfi* set1, set2 ve set4 primer çiftleri ile belirtilen tüm *T. annulata* izolatlarının sırasıyla 182 ve 195 bp'lık bölümleri özgül olarak çoğaltılırken (Resim 3.A.3), *T. parva* ve BL20 ile hiçbir ürün çoğaltılmamıştır. Ancak, *Sfi* set4 primer çiftleri ile çoğaltılan ürünler set1 ve set2 primer çiftleri kadar iyi sonuç vermemiş ve jel elektroforezindeki 174 bp'lık bantların oldukça zayıf olduğu gözlenmiştir. *Sfi* set1 primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucu elde edilen ürünlerin jel elektroforezinde özgül olmayan ve yaklaşık 140 bp'lık ikincil bantlara rastlanmıştır. Bunun yanında *Sfi* set3 primer çifti bazı *T. annulata* izolatlarını (Ode, Aydın, A.ova, Diyarbakır) çoğaltılamamıştır.

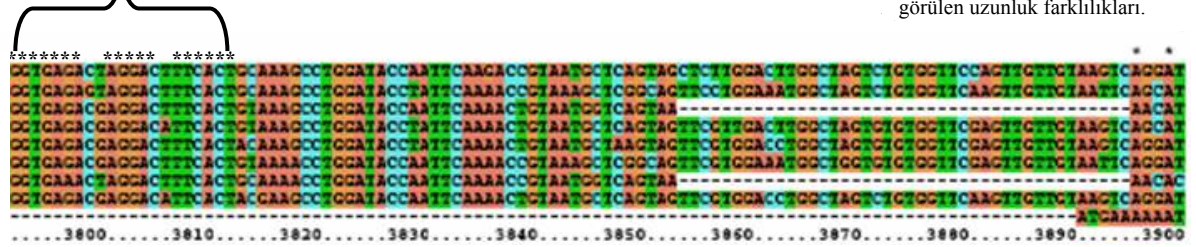


**Şekil 3.A.1.** *Theileria annulata* *Sfi* gen ailesindeki korunmuş bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan primer çiftlerinin (*Sfi* set1F/R, *Sfi* set2F/R, *Sfi* set3F/R, *Sfi* set4F/R) yerleşim yerleri şematik olarak gösterimi. Her bir primer bölgesinin gen üzerindeki yeri açık ve koyu gri renkte **gölgelenmiş kutucuklar** ile belirtilmiştir. Her bir primer çiftinin çoğalttığı bölge ve bunları uzunlukları, ilgili primerlerin ileri ve geri yönlü bölgeleri arasında baz çifti (bp) olarak belirtilmiştir.



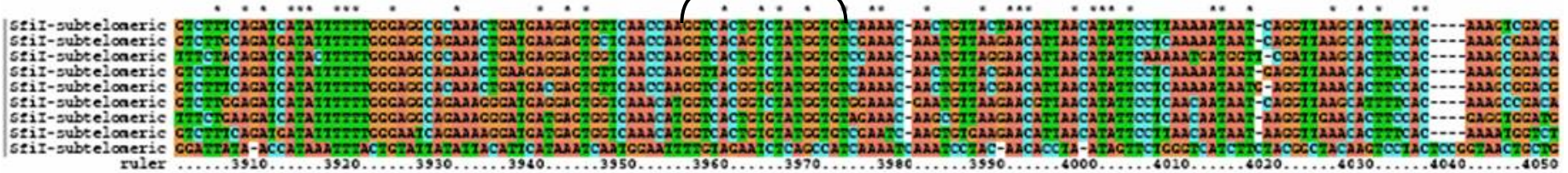
**Şekil 3.A.2.** *Theileria annulata* *Tar* gen ailesindeki korunmuş bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan primer çiftlerinin (*Tar* A1F/R, *Tar* B1F/R, *Tar* C1F/R, *Tar* D1F/R, *Tar* E1F/R) yerleşim yerleri şematik olarak gösterimi. Her bir primer bölgesinin gen üzerindeki yerleri **gölgelenmiş kutucuklar** ile belirtilmiştir. Her bir primer çiftinin çoğalttığı bölge ve bunları uzunlukları, ilgili primerlerin forward ve reverse bölgeleri arasında baz çifti (bp) olarak belirtilmiştir.

*Sfi* set1 F

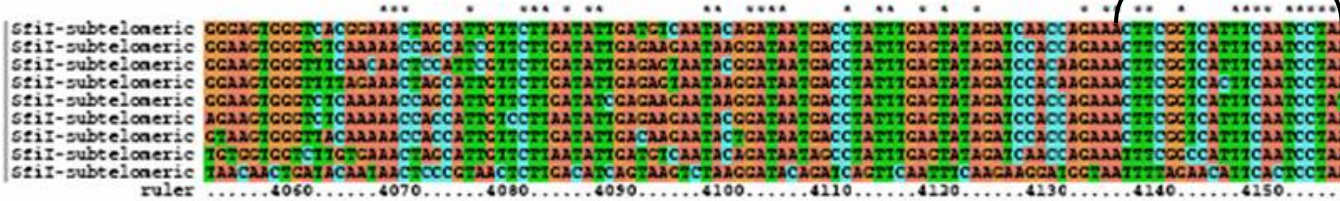


*Sfi* gen ailesinde bulunan farklı gen bölgelerinde *Sfi* set2 primer çiftleri ile çoğaltılan bölgede görülen uzunluk farklılıkları.

*Sfi* set1 R ve *Sfi* set2 F



*Sfi* set2



Resim 3.A.1. *Sfi* genine ait korunmuş bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan *Sfi* set1 ve *Sfi* set2 primer çiftlerinin tasarlandığı bölgeler.

*Sfi* set3

```
***** ** * ***** ** * *****
AAAGGCAGTACTGATGGCTTACGGGGGAGCAAAC
AAAGGCAGTACTGATGGCTTACGGGGGAGCAAAC
AAAGGCAGTACTGATGGCTTACGGGGGAGCAAAC
AAAGGCAGTACTGATGGCTTACGGGGGAGCAAAC
AAAGGCAGTACTGATGGCTTACGGGGGAGCAAAC
AAAGGCAGTACTGATGGCTTACGGGGGAGCAAAC
AAAGGCAGTACTGATGGCTTACGGGGGAGCAAAC
AAAGGCAGTACTGATGGCTTACGGGGGAGCAAAC
AAAGGCAGTACTGATGGCTTACGGGGGAGCAAAC
AAAGGCAGTACTGATGGCTTACGGGGGAGCAAAC
AAAGGCAGTACTGATGGCTTACGGGGGAGCAAAC
AAAGGCAGTACTGATGGCTTACGGGGGAGCAAAC
4310.....4320.....4330.....4340.....
```

```
* * * * * ** ** ** * * * * *
-subtelomeric CCAATCCGCCACAGCGGTAACTCTTAAGCAAGCTTTACAAATTAACATCGARAGATATCACTAAGCAAAAGCACTGATTTCTCAGATAACARGATATCTCCCTGGATGAAGGTTACATCCCACTATCTGAACT
-subtelomeric CCAATCCGCCACAGCGGTAACTCTTAAGCAAGCTTTACAAATTAACATCGARAGATATCACTAAGCAAAAGCACTGATTTCTCCGCTAACAGATCTACTCCCTGGARAGAGGTTACATCCCACTATCTGAACT
-subtelomeric CCAATCCGCCACAGCGGTAACTCTTAAGCAAGCTTTACAAATTAACATCGARAGATATCACTAAGCAAAAGCACTGATTTCTCCGCTAACAGATCTACTCCCTGGARAGAGGTTACATCCCACTATCTGAACT
-subtelomeric CCAATCCGCCACAGCGGTAACTCTTAAGCAAGCTTTACAAATTAACATCGARAGATATCACTAAGCAAAAGCACTGATTTCTCCGCTAACAGATCTACTCCCTGGARAGAGGTTACATCCCACTATCTGAACT
-subtelomeric CCAATCCGCCACAGCGGTAACTCTTAAGCAAGCTTTACAAATTAACATCGARAGATATCACTAAGCAAAAGCACTGATTTCTCCGCTAACAGATCTACTCCCTGGARAGAGGTTACATCCCACTATCTGAACT
-subtelomeric CCAATCCGCCACAGCGGTAACTCTTAAGCAAGCTTTACAAATTAACATCGARAGATATCACTAAGCAAAAGCACTGATTTCTCCGCTAACAGATCTACTCCCTGGARAGAGGTTACATCCCACTATCTGAACT
-subtelomeric CCAATCCGCCACAGCGGTAACTCTTAAGCAAGCTTTACAAATTAACATCGARAGATATCACTAAGCAAAAGCACTGATTTCTCCGCTAACAGATCTACTCCCTGGARAGAGGTTACATCCCACTATCTGAACT
-subtelomeric CCAATCCGCCACAGCGGTAACTCTTAAGCAAGCTTTACAAATTAACATCGARAGATATCACTAAGCAAAAGCACTGATTTCTCCGCTAACAGATCTACTCCCTGGARAGAGGTTACATCCCACTATCTGAACT
ruler .....4360.....4370.....4380.....4390.....4400.....4410.....4420.....4430.....4440.....4450.....4460.....4470.....4480.....4490.....
```

*Sfi* set3 R ve *Sfi* set4 F

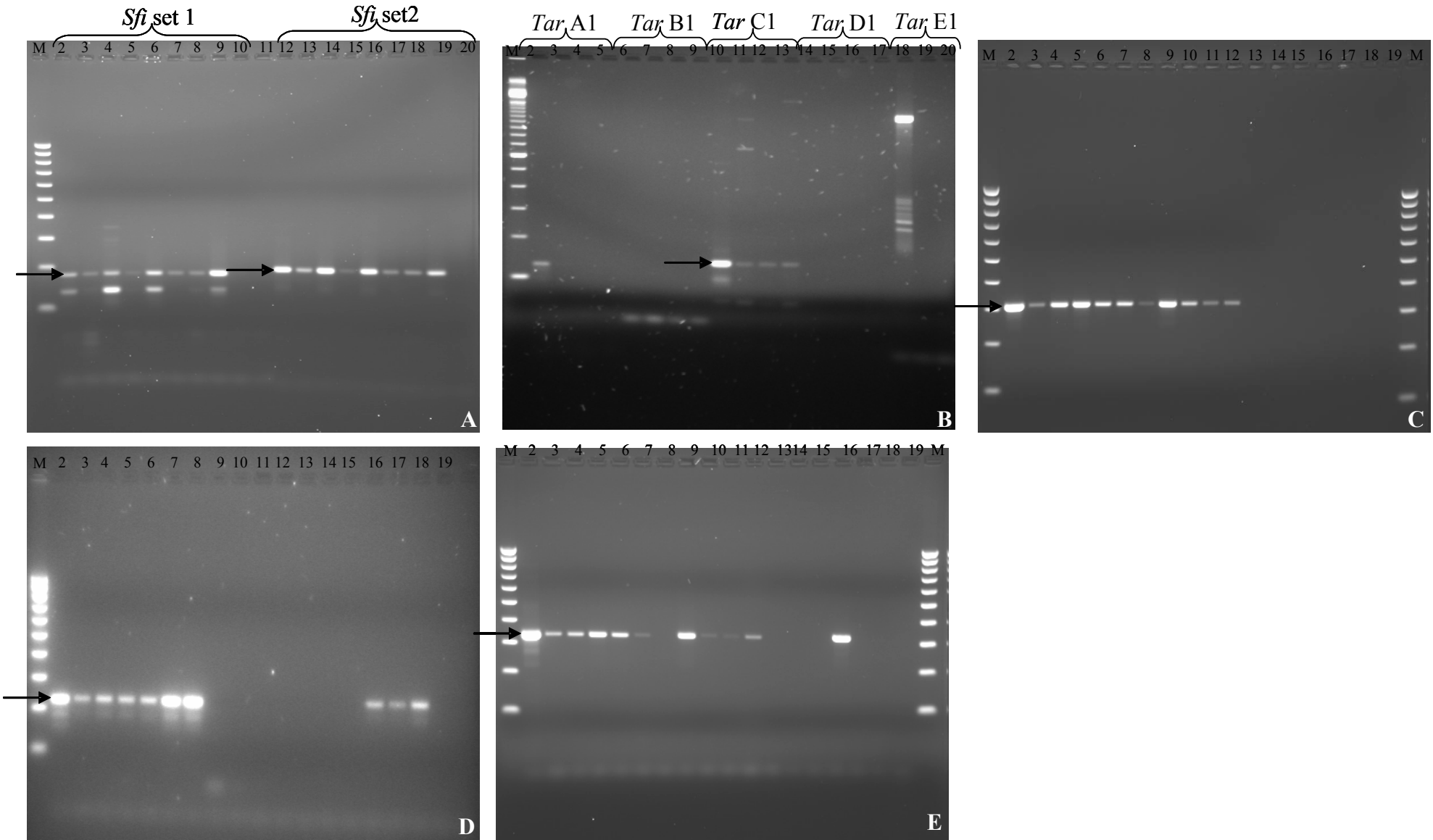
```
***** ***** ** ** *
-subtelomeric AGACTCAATATGATCCAAATAATACCGCTCAGATATGGCTTACGCTTAAAGCAAGCTTCCAGCTCTTANGATCACTAACAATGATAAGCTACTGGTCCACATACTGATGATCCCGAGTACGGGTAACCGAAAGGCTGATA
-subtelomeric AGACTCAATATGATCCAAATAATACCGCTCAGATATGGCTTACGCTTAAAGCAAGCTTCCAGCTCTTANGATCACTAACAATGATAAGCTACTGGTCCACATACTGAGGTAACCGAAAGGCTGATA
-subtelomeric ATAAATCAATATGATCCAAATAATACCGCTCAGATATGGCTTACGCTTAAAGCAAGCTTCCAGCTCTTANGATCACTAACAATGATAAGCTACTGGTCCACATACTGATGATCCCGAGTACGGGTAACCGAAAGGCTGATA
-subtelomeric CGAAATCAATATGATCCAAATAATACCGCTCAGATATGGCTTACGCTTAAAGCAAGCTTCCAGCTCTTANGATCACTAACAATGATAAGCTACTGGTCCACATACTGATGATCCCGAGTACGGGTAACCGAAAGGCTGATA
-subtelomeric ATACTCAATATGATCCAAATAATACCGCTCAGATATGGCTTACGCTTAAAGCAAGCTTCCAGCTCTTANGATCACTAACAATGATAAGCTACTGGTCCACATACTGATGATCCCGAGTACGGGTAACCGAAAGGCTGATA
-subtelomeric AGAAATCAATATGATCCAAATAATACCGCTCAGATATGGCTTACGCTTAAAGCAAGCTTCCAGCTCTTANGATCACTAACAATGATAAGCTACTGGTCCACATACTGATGATCCCGAGTACGGGTAACCGAAAGGCTGATA
-subtelomeric ATAAATCAATATGATCCAAATAATACCGCTCAGATATGGCTTACGCTTAAAGCAAGCTTCCAGCTCTTANGATCACTAACAATGATAAGCTACTGGTCCACATACTGATGATCCCGAGTACGGGTAACCGAAAGGCTGATA
-subtelomeric ATACTCAATATGATCCAAATAATACCGCTCAGATATGGCTTACGCTTAAAGCAAGCTTCCAGCTCTTANGATCACTAACAATGATAAGCTACTGGTCCACATACTGATGATCCCGAGTACGGGTAACCGAAAGGCTGATA
ruler .....4510.....4520.....4530.....4540.....4550.....4560.....4570.....4580.....4590.....4600.....4610.....4620.....4630.....4640.....
```

*Sfi* set4 R

```
***** **
-subtelomeric ATCTCCCAAGCAAGCTTCACTTCCACAAATC
-subtelomeric ATCTCCCAAGCAAGCTTCACTTCCACAAATC
-subtelomeric ATCTCCCAAGCAAGCTTCACTTCCACAAATC
-subtelomeric ATCTCCCAAGCAAGCTTCACTTCCACAAATC
-subtelomeric ATCTCCCAAGCAAGCTTCACTTCCACAAATC
-subtelomeric ATCTCCCAAGCAAGCTTCACTTCCACAAATC
-subtelomeric ATCTCCCAAGCAAGCTTCACTTCCACAAATC
-subtelomeric ATCTCCCAAGCAAGCTTCACTTCCACAAATC
-subtelomeric ATCTCCCAAGCAAGCTTCACTTCCACAAATC
ruler .....4660.....4670.....4680.....
```

Resim3.A.2. *Sfi* genine ait korunmuş bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan *Sfi* set3 ve *Sfi* set4 primer çiftlerinin tasarlandığı bölgeler.





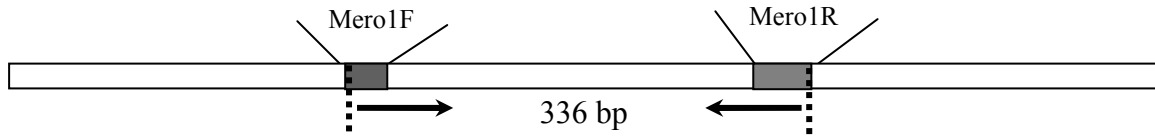
**Resim 3.A.3.** *Sfi* set1 ve set2, *Tar* A1, B1, C1, D1 ve E1, *Cyto* b1 ve b2, *Mero* I primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR sonuçları (*Devam*),

**Resim 3.A.3.** *Sfi* set1 ve set2, *Tar* A1, B1, C1, D1 ve E1, Cyto b1 ve b2, MeroI primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR sonuçları. (A); ve 20'inci kuyucuklarda; 1'inci kuyuda 100 bp'lik moleküler büyüklük belirleyici (Thermo Scientific Corp.); 11'inci kuyuda PZR negatif kontrol (su); 2–10 ve 12–20'inci kuyularda *T. annulata*'nın farklı izolatları Gharb, İsrail, Ode, A.ova, Dalama, Pendik, Aydın, Diyarbakır ait DNA örnekleri konulmuştur. *Sfi* set1 ve set2 primer çiftlerinin özgül olarak çoğaltıkları sırası ile 182 ve 196 bp'lik bölgeler **ok işaretleri** ile gösterilmiştir. (B); 1 ve 20'inci kuyucuklarda; 1'inci kuyuda 100 bp'lik moleküler büyüklük belirleyici (Thermo Scientific Corp.); 2–5, 6–9, 10–13, 14–17, 18–20'inci kuyularda *T. annulata*'nın Tunus, İran, Aydın, Diyarbakır izolatlarına ait DNA örnekleri konulmuştur. *Tar* C1 primer çiftini kullanılarak spesifik olarak çoğaltılan 136 bp'lik bölge **ok işareti** ile gösterilmiştir. (D); 1 ve 20'inci kuyucuklarda; 1'inci kuyuda 100 bp'lik moleküler büyüklük belirleyici (Thermo Scientific Corp.); 2 ile 8 arasındaki kuyucuklarda (2 ve 8 dahil) *T.annulata*'nın farklı izolatları Tunus, İran, Umbanein, Gharb, İsrail, Ode; 9 uncu kuyuda enfekte olmayan sığır PBM; 10' üncü kuyuda *T. parva*; 11'inci kuyuda *T. sergenti*; 12'inci kuyuda *T. lestoquardi*; 13'üncü kuyuda *B. bovis*; 14'üncü kuyuda *B. bigemina*; 15'inci kuyuda *T. equi*; 16'ıncı kuyuda *T.annulata* Aydın izolatu; 17'inci kuyuda *T.annulata* Diyarbakır izolatu; 18'inci kuyuda *T.annulata* A.ova izolatu; 19'uncu kuyuda *T.annulata* Dalama izolatına ait DNA örnekleri konulmuştur. Cyto b2 primer çiftini kullanılarak spesifik olarak çoğaltılan 232 bp'lik bölge **ok işareti** ile gösterilmiştir. (C ve E); 1 ve 20'inci kuyucuklarda; 1 ve 20'inci kuyuda 100 bp'lik moleküler büyüklük belirleyici (Thermo Scientific Corp.); 2 ile 12 arasındaki kuyucuklarda (2 ve 12 dahil) *T.annulata*'nın farklı izolatları Tunus, İran, Umbanein, Gharb, İsrail, Ode, A.ova, Dalama, Pendik, Aydın, Diyarbakır; 13'üncü kuyuda enfekte olmayan sığır PBM; 14'üncü kuyuda *T. parva*; 15'inci kuyuda *T. sergenti*; 16'ıncı kuyuda *T. lestoquardi*; 17'inci kuyuda *B. bovis*; 18'inci kuyuda *B. bigemina*; 19'uncu kuyuda *T. equi* ait DNA örnekleri konulmuştur. Cyto b1 primer çiftini kullanılarak spesifik olarak çoğaltılan 312 bp'lik bölge **ok işareti** ile gösterilmiştir. MeroI primer çiftini kullanılarak özgül olarak çoğaltılan 334 bp'lik bölge **ok işareti** ile gösterilmiştir.

*Sfi* gen ailesinde bulunan 8 gendeki korunmuş bölgeleri çoğaltmak için tasarlanan *Sfi* set1, set2, set3 ve set4 primer çiftlerinden elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş ve *Sfi* set2 primer çifti haricindeki diğer primer çiftleri özgül olmayan bantların oluşması, bazı *T.annulata* izolatlarını çoğaltmada yetersiz kalması ve çoğaltılan ürünlerin miktar olarak oldukça az olması gibi sebeplerden ötürü bir sonraki aşama olan duyarlılığın belirlenmesinde kullanılmamıştır.

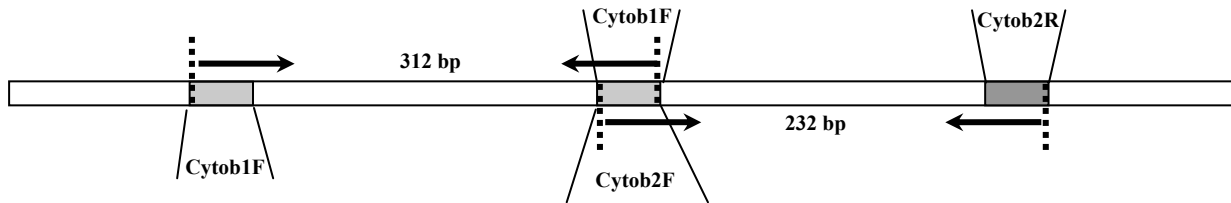
*Tar* gen ailesindeki genleri çoğaltmak için kullanılacak primerlerin tasarlanmasında clustal X (1.83) bilgisayar programı kullanılmış ve 93 gen birbirleri arasında karşılaştırılarak korunmuş bölgeler tespit edilmiştir. Yapılan karşılaştırma sonucunda 93 genin 25 tanesinde bulunan korunmuş bölgeleri çoğaltmak amacıyla *Tar* A1, B1, C1, D1 ve E1 olmak üzere beş primer çifti tasarlanmıştır. Bu primer çiftleri ailede bulunan 25 gende sırası ile 124, 151, 136, 238 ve 300–378 bp'lık bölgeleri çoğaltmaktadır, primer çiftlerinin 5'-3' yönlü nükleotid dizilimleri Çizelge 3.A.3'de verilmiştir. Şekil 3.A.2'de belirtildiği üzere *Tar* D1 ileri ve *Tar* E1 geri yönlü primerleri aynı bölgeden tasarlanmış olup birbirinin ters yönlü komplementerleridir. *Tar* E1 ileri yönlü primeri, *Tar* C1 primer çiftinin çoğalttığı bölge içerisinden tasarlanmıştır. Primer çiftlerinin özgüllüğünün belirlenmesi amacıyla farklı *T.annulata* izolatları (Tunus, İran, Sudan, Mısır, Hindistan, İsrail, Ankara/D7, Aydın Diyarbakır, A.ova, Dalama, Pendik), *T. parva* ile BL20 kullanılarak yapılan PZR sonuçları Çizelge 3.A.4'de verilmiştir. Buna göre A1, B1, D1 ve E1 primer çiftleri ile her hangi bir ürün çoğaltılamamıştır. *Tar* C1 primer çifti ile *T. annulata*'nın A.ova, Dalama ve Pendik izolatları dışında kalan diğer *T. annulata* izolatlarını özgül olarak çoğaltılmış, *T. parva* ve BL20 DNA'ları ile hiçbir ürün elde edilmemiştir. Tasarlanan primer çiftlerinin bağlanma ısılarının 50°C'nin altında olması ve bu ısının altındaki derecelerde PZR'da elde edilen ürünlerin özgüllüklerinde yaşanabilecek sorunlar ile karşılaşmamak için daha sonraki aşamalarda kullanılmamışlardır.

*SVSP* gen ailesinde bulunan 51 paralog gen bölgesinin karşılaştırılmasında genler arasında yaygın heterojenite ile genler arasında mevcut nükleotid dizilimlerinde çok sayıda bölgedeki ilave ve silinmeler primer tasarlanmasını olanaksız hale getirmiştir. Önceki çalışmalarda C-terminal bölgedeki polipeptidlerin daha az sayıda indel içeren korunmuş bir bölge (Schmuckli-Maurer ve ark 2009) olduğu belirtilmesine rağmen yapılan incelemelerde bu bölgede nükleotid düzeyinde paralog genler arasında önemli ölçüde farklılık görülmüştür.



**Şekil 3.A.3.** *Theileria annulata* MeroI geni üzerinde Mero1F ve Mero1R primer bölgelerinin şematik gösterimi. Her primer bölgesinin gen üzerindeki yeri **gölgelenmiş kutucuklar** ile belirtilmiştir. MeroI F/R primer çiftleri kullanılarak çoğaltılan bölgeler **ok** işaretleri ile gösterilmiştir.

Tek kopyalı bir gen olan MeroI genini çoğaltmada kullanılan primer çiftinin tasarlanması amacıyla farklı *T. annulata* izolatları arasında 334 bp'lık korunmuş bölge belirlenmiş ve bu bölgeyi çoğaltmak amacıyla MeroI primer çifti tasarlanmıştır (Şekil 3.A.3). Tasarlanan primer çiftinin özgüllüğünün belirlenmesi amacıyla farklı *T. annulata* izolatları (Tunus, İran, Sudan, Mısır, Hindistan, İsrail, Ankara/D7, Aydın Diyarbakır, A.ova, Dalama, Pendik) ile *T. parva*, *T. sergenti*, *T. lestoquardi*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *T. equi* ve BL20 kullanılarak yapılan PZR sonuçları Çizelge 3.A.4'de verilmiştir. Buna göre MeroI primer çifti kullanılan tüm *T. annulata* izolatlarında beklendiği şekilde 334 bp'lık bölgeyi özgül olarak çoğaltmış ve *T. lestoquardi* haricindeki kullanılan diğer *Theileria* ve *Babesia* türlerinde herhangi bir çoğalma gözlenmemiştir (Resim 3.A.3).



**Şekil 3.A.5.** *Theileria annulata* mitokondriyal sitokrom b geni üzerinde Cytob1F/R ve Cytob2F/2R primer bölgelerinin şematik olarak gösterimi. Her primer bölgesinin gen üzerindeki yeri **gölgelenmiş kutucuklar** ile belirtilmiştir. Cytob1F/R ve Cytob2F/2R primer çiftleri kullanılarak çoğaltılan bölgeler **ok** işaretleri ile gösterilmiştir.

Yukarıda bahsedilen gen ailelerinden farklı olarak sitokrom b geni tek kopyalı bir genidir. *T. annulata* sitokrom b genini çoğaltmada kullanılacak primerlerin tasarlanması amacıyla *T. annulata* (XM949625.1), *T. parva* (Z23263.1), *B. bovis* (EU075182.1), *B. bigemina* (AF109354.1) türlerine ait sitokrom b gen dizilimleri clustal X (1.83) bilgisayar programı kullanılarak birbirleri ile karşılaştırılmış (Şekil 3.A.4) ve geni çoğaltmada kullanılacak Cytob1 ve Cytob2 primerleri *T. annulata* sitokrom b genine özgü iyi korunmuş olan ve diğer *Theileria/Babesia* türlerine göre farklılık gösteren bölgelerden tasarlanmıştır.



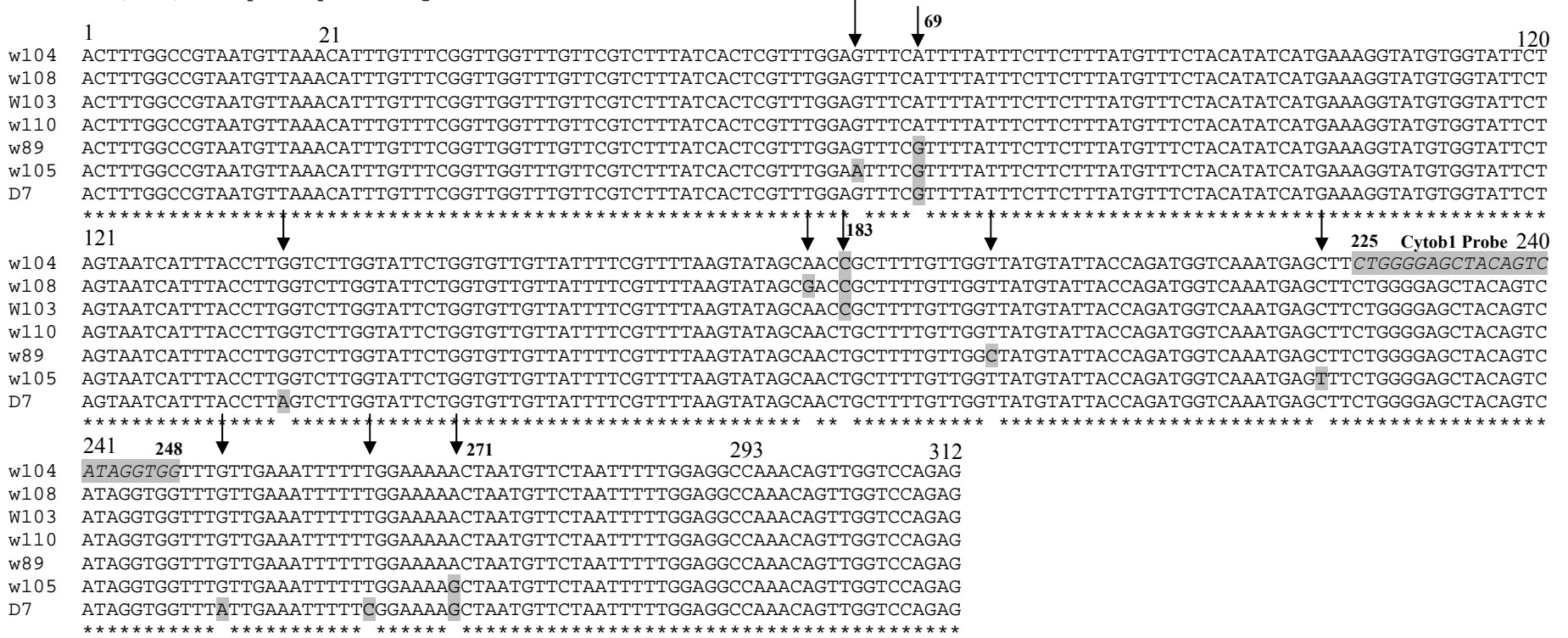
Tasarlanan primer çiftleri sırasıyla 312 ve 232 bp'lik bölgeleri çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır, primer çiftlerinin 5'–3' yönlü nükleotid dizimleri Çizelge 3.A.3'de belirtildiği şekildedir. Sitokrom b genine ait bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan cyto b1 geri yönlü primeri ile cyto b2 ileri yönlü primerleri aynı bölgeden tasarlanmış olup birbirinin ters yönlü komplementerleri şeklindedirler (Şekil 3.A.5).



**Şekil 3.A.4.** *Theileria annulata* (XM949625.1), *B. bovis* (EU075182.1), *B. bigemina* (AF109354.1) ve *T. parva* (Z23263.1) türlerine ait mitokondriyal cytochrome b gen dizilimlerinin clustal X (1.83) programı kullanılarak birbirleri ile karşılaştırılması. Karşılaştırılan nükleotid dizilimleri arasındaki korunmuş bazlar '\*' ile karşılaştırılan dizilerdeki boşluklarda '-' ile belirtilmiştir. **Gölgelenmiş bölgeler** *T. annulata*'ya spesifik primer çiftinin (Cytob1 forward; 166–186, Cytob1 reverse; 477–459 ve Cytob2 forward; 459–477, Cytob2 reverse; 690–672 primer çiftleri) tasarlandığı yerleri göstermektedir. **379 ve 413. bazlar arasındaki gölgelenmiş alan** RLB hibridizasyonunda kullanılmak üzere tasarlanan Cytob1 probunun yerini göstermektedir.

Cyto b1 ve b2 primer çiftlerinin özgüllüklerinin belirlenmesi amacıyla farklı *T.annulata* izolatları (Tunus, İran, Sudan, Mısır, Hindistan, İsrayil, Ankara/D7, Aydın Diyarbakır, A.ova, Dalama, Pendik) ile *T. parva*, *T. sergenti*, *T. lestoquardi*, *B. bovis*, *B.bigemina*, *T. equi* ve BL20 kullanılarak yapılan PZR sonuçları Çizelge 3.A.4’de verilmiştir. Buna göre cyto b1 primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda 312 bp’lık bölüm kullanılan tüm *T. annulata* izolatlarında beklendiği şekilde çoğaltılmış ve kullanılan diğer *Theileria* ve *Babesia* türlerinde herhangi bir çoğalma gözlenmemiştir (Resim 3.A.3). Ayrıca çoğaltılan bantlar aynı yoğunlukta olmayıp *T. annulata*’nın Tunus, Sudan ve Mısır izolatlarında daha güçlü bantlar görülmüştür. Bu fark muhtemelen kullanılan parazit DNA’sının farklı miktarlarda olmasından kaynaklanmıştır. Cyto b2 primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda 232 bp’lık bölüm kullanılan tüm *T. annulata* izolatlarında beklendiği şekilde çoğaltılmış ve diğer *Theileria* ve *Babesia* türlerinde herhangi bir çoğalma gözlenmemiştir (Resim 3.A.3). Bununla birlikte cyto b2 PZR’u sonucunda beklenmeyen 200 bp büyüklüğünde ikinci bir bant daha gözlenmiştir. Bu ikincil bant oluşumundan dolayı cyto b2 primer çifti daha sonraki aşamalarda kullanılmamıştır. Cyto b1 primer çifti ile çoğaltılan yedi farklı *T. annulata* (Tunus, Akçaova, Dalama, Pendik, Aydın, Diyarbakır ve Ankara/D7) izolatının 312 bp’lık bölgelerinin sekans analiz sonuçları Şekil 3.A.6’da verilmiştir. Dizilim analiz sonuçları karşılaştırıldığında (Şekil 3.A.6) farklı alleller arasında nükleotid seviyesinde yüksek oranda benzerlik görülmüştür. Kullanılan yedi izolatın üç tanesi Aydın ve civarındaki bölgeleri (W104; Dalama, W108; Aydın ve W103; A.ova), üç tanesi Türkiye’nin farklı bölgelerini (W110; Diyarbakır, W105; Pendik, D7; Ankara/D7) ve biri de tamamen farklı bir coğrafik bölge olan Tunus’u (W89; Tunus) temsil etmektedir. Farklı alleller arasında on tane tek nükleotid farklılığı (SNP) gösteren pozisyon belirlenmiş (Şekil 3.A.6). Tek nükleotid farklılığı gösteren bölgelerden 69 ve 183. pozisyonlarda oluşanlar üç farklı allelde de görülürken, 271. pozisyonadaki değişiklik sadece iki allelde gözlenmiştir.

CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment



**Şekil 3.A.6.** *Theileria annulata*'nın farklı izolatlarının (W104; Dalama, W108; Aydın, W103; A.ova, W110; Diyarbakır, W89; Tunus, W105; Pendik and D7; Ankara/D7) sekans analizi sonuçlarının clustal X (1.83) programı ile karşılaştırılması. Karşılaştırılan nükleotid dizilimleri arasındaki korunmuş bazlar '\*' ile gösterilmiştir. Karşılaştırılan dizilimler arasındaki tek nükleotid farklılıkları (SNP; single nucleotide polymorphisms) ok işareti ile, bu bölgelerdeki farklılaşmalarda **gölgelenmiş bazlar** olarak ile gösterilmiştir. 1–21 ve 293–312 numaralı pozisyonlar arasında kalan bölgeler sırası ile Cytob1 forward ve Cytob1 reverse primer çiftinin yerini göstermektedir. **225 ve 248. bazlar arasında italik, bold yazılmış gölgeli alan** RLB hibridizasyonunda kullanılmak üzere dizayn edilen Cytob1 probunun yerini göstermektedir.

### 3.A.2.2. Ctyo b1, MeroI, Sfi set 2, Tams-1 ve ssu rRNA Primer Çiftlerinin Duyarlılıklarının Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Karşılaştırılması

Ctyo b1, MeroI, Sfi set2, Tams-1 ve ssu rRNA primer çiftlerinin duyarlılıkları *T.annulata* Ankara suşu ile enfekte edilen hayvana ait bilinen piroplasm parazitemideki (%1) kanın enfekte olmaya kan kullanılarak 10 katlı sulandırılması ile elde edilen %0.1-%10<sup>-10</sup> parazitemiye sahip kanlardan ayrılan DNA örnekleri (Gereç ve Yöntem/Deneysel Enfeksiyon) ve *T. annulata* Ankara/D7 makroşizont hücre kültüründen hazırlanan ve saf su kullanılarak 10 katlı sulandırılan DNA örnekleri kullanılarak yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel (%1.5) elektrofrezisi ile belirlenmiştir (Çizelge 3.A.5).

Çizelge 3.A.5. PZR’unda kullanılan primer çiftlerinin duyarlılıklarını gösteren tablo

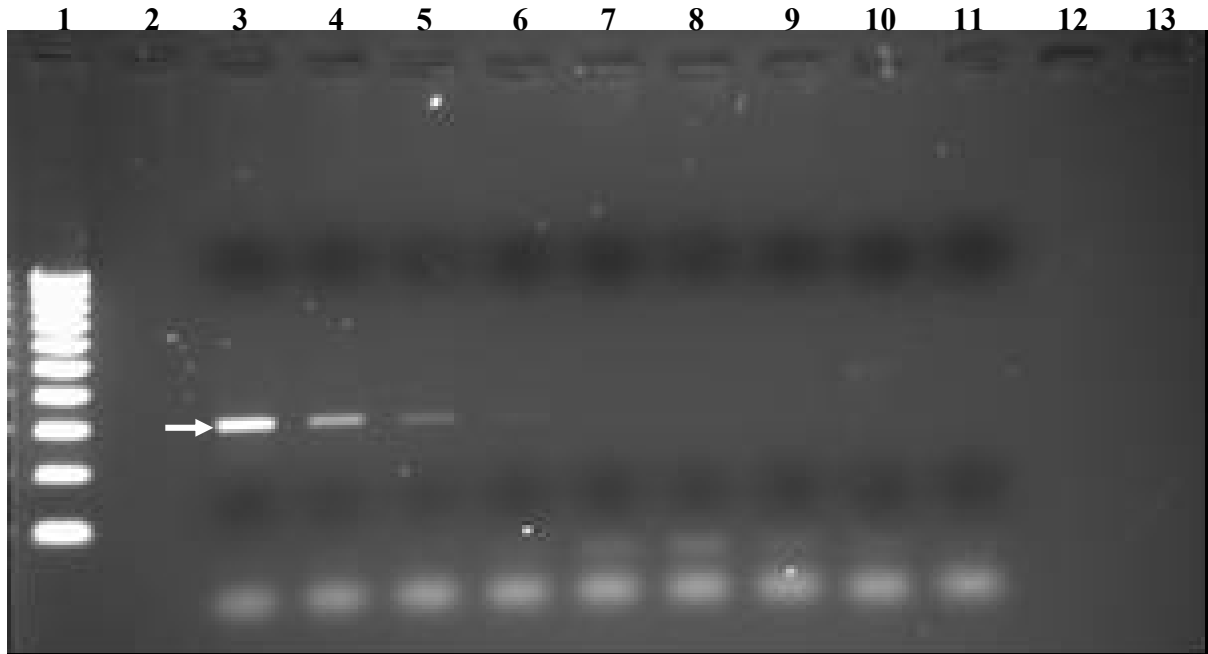
10 katlı DNA sulandırmaları	PZR’ da Kullanılan Primer Çiftleri				
	Cyto b1	MeroI	Sfi set 2	Tams-1	ssu rRNA
Deneysel enfeksiyon	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3*</sup>	Özgül değil
Ankara/D7 hücre kültürü	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-8</sup>	Belirlenmedi	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>

(\*); 10<sup>-4</sup> üncü sulandırmada görüntülenen bantın özgülüğü tam olarak belirlenememiştir.

*Theileria annulata* Ankara/D7 makroşizont hücre kültüründen ayrılan ve saf su kullanılarak 10 katlı sulandırılan DNA örnekleri ile yapılan PZR’u sonucunda cyto b1, MeroI, Tams-1 ve ssu rRNA primer çiftlerinin duyarlılıkları sırası ile 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup> ve 10<sup>-8</sup> olarak belirlenmiştir. Sfi set2 primer çiftinin duyarlılığı belirlenmemiştir. Duyarlılığın belirlenmesinde kullanılan *T. annulata* Ankara suşu ile enfekte edilen hayvana ait bilinen piroplasm parazitemideki (%1) kanın enfekte olmayan kan kullanılarak 10 katlı sulandırılması ile elde edilen %0.1-%10<sup>-10</sup> parazitemiye sahip kanlardan ayrılan DNA örnekleri ile yapılan PZR’u sonucunda cyto b1, MeroI, Sfi set2, Tams primer çiftlerinin duyarlılıkları sırası ile 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> ve 10<sup>-3</sup> olarak belirlenmiştir. Tams primer çifti ile elde edilen sonuçlarda 10<sup>-4</sup> üncü sulandırmada görüntülenen bant olması gerekenden (721 bp) daha büyük (≤800 bp) ve 10<sup>-3</sup> sulandırmadaki gibi zayıf olarak görüntülediği için özgülüğü tam olarak belirlenememiştir. Ssu rRNA primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda ise elde edilen ürünlerde özgül olmayan bantlara fazla oranda rastlanmıştır ve duyarlılığı tam olarak belirlenememiştir. Cyto b1 primer çifti ethidyum bromid ile boyanmış agaroz jel elektrofrezisi ile 312 bp’lik bölgeyi özgül olarak 10<sup>-4</sup> sulandırmaya kadar çoğaltmıştır (Resim 3.A.4). Sığır kanının µl’inde 10<sup>7</sup> eritrosit olduğu farz edildiğinde (Bhannasir ve ark 1961) cyto b1

primer çifti ethidyum bromid ile boyalı agaroz jelde %0.0001 parazitemiye yani her 1 µl kanda 10 piroplasmı belirlemiştir. Bu miktar Mero I primer çifti için 1000 piroplasm, *Sfi* set2 ve Tams primer çiftleri için 100 piroplasm olarak belirlenmiştir. Ethidyum bromid ile boyanan agaroz jel örneklerinde elde edilen sonuçlar bize duyarlılığı tam olarak verememektedir, çünkü ethidyum bromid PZR ile çoğaltılan çift sarmallı DNA'nın ancak belli bir orana kadar ( $\geq 10$  µg) olanını UV ışık altında görüntülenebilmesine olanak sağlamaktadır. Duyarlılığın tam olarak belirlenebilmesi için blotlama gibi duyarlılığı daha yüksek olan testlere gereksinim vardır. Bu amaçla ethidyum bromid boyamada en yüksek duyarlılığı veren cyto b1 primer çifti kullanılarak bir sonraki kısımda anlatıldığı şekilde RLB hibridizasyonu yapılarak duyarlılığı belirlenmiştir ve elde edilen sonuçlar 18S RLB hibridizasyonu ile elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır.

Cytob1 primer çifti ile her sulandırma basamağından alınan 100 mikrolitre kan örneği damlatılarak hasırlanan FTA kartları kullanılarak yapılan PZR sonucunda hiçbir sitokrom b genine ait 312 bp'lik bölge çoğaltılamamıştır.



**Resim 3.A.4.** *Theileria annulata* Ankara izolatu ile enfekte edilen sığır kanının on katlı olarak enfekte olmayan sığır kanında sulandırılması ile elde edilen DNA örnekleri kullanılarak Cytob1 PCR'ının sensitivitesinin belirlenmesi. 1'inci kuyu 100 bp'lik moleküler büyüklük belirleyici (Thermo Scientific Corp.); 2'inci kuyu kontrol (su); 3 ile 12'inci kuyularda (3 ve 12 dahil) %0.1'den başlayıp  $10^{-10}$ 'a kadar devam eden on katlı sulandırma örnekleri; 13'üncü kuyu enfekte olmayan sığır PBM. Cytob1 primer çiftini kullanarak spesifik olarak çoğaltılan 312 bp'lik bölge **ok işareti** ile gösterilmiştir.

### 3.A.2.3. Cyto b1 ile RLB F/R Primer Çiftlerinin Duyarlılıklarının RLB Hibridizasyonu ile Karşılaştırılması

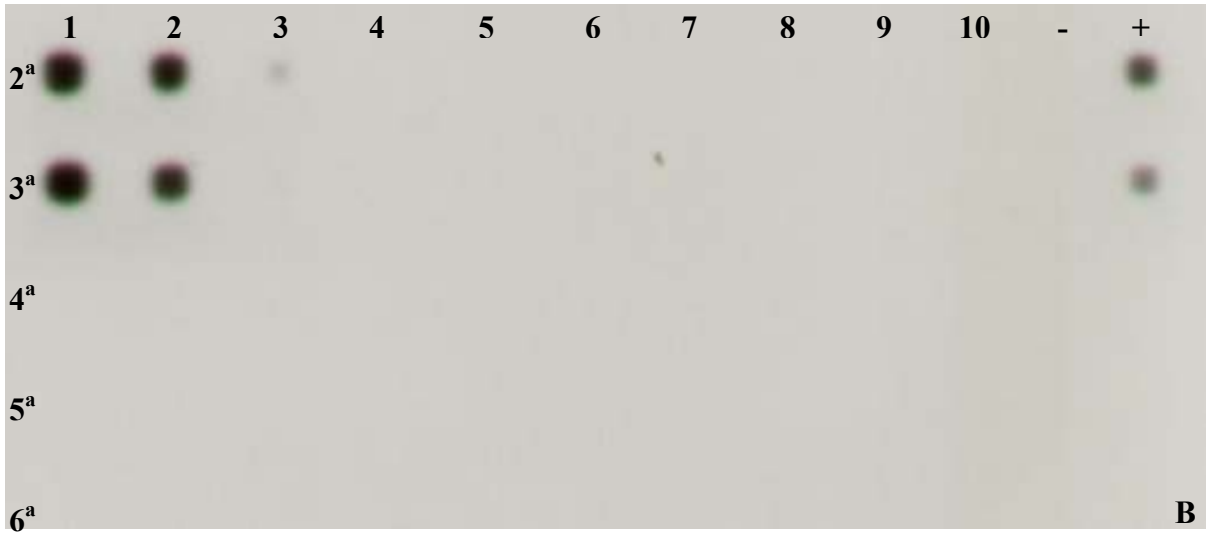
Cyto b1 primer çiftinin duyarlılık sınırının belirlenmesi için *T. annulata* Ankara suşu ile enfekte edilen hayvana ait bilinen piroplasm parazitemideki (%1) kanın enfekte olmaya kan kullanılarak 10 katlı sulandırılması ile elde edilen %0.1-%10<sup>-10</sup> parazitemiye sahip kanlardan ayrılan DNA örnekleri (Gereç ve Yöntem/Deneysel Enfeksiyon) kullanılarak elde edilen PZR ürünleri, daha önceden *T. annulata* cytochrome b genine özgü 5'-biotin ile işaretlenmiş oligonükleotid probun (Şekil 3.A.4) N ucunda bulunan N-(trifluoracetamidohexyl-cyanoethyl, N, N-diisopropyl phosphoamidite [TFA]-C<sub>6</sub> amino bağlayıcılar yardımıyla kovalent olarak bağlandığı membrana blotlanmıştır. Yapılan RLB sonucunda cyto b1 primer çiftinin duyarlılığı %10<sup>-6</sup> parazitemi olarak belirlenmiştir (Resim 3.A.5 (A), sıra 6). Resim 3.A.5 (A), sıra 5'de görülen noktanın yoğunluğu beklenenin aksine daha yoğun olmuş ve bununla beraber dokuzuncu sırada %10<sup>-9</sup> parazitemiye denk gelen sulandırmada düşük yoğunlukta, özgül olamayan bir nokta daha gözlemlenmiştir. PZR'da kontrol amacıyla kullanılan enfekte olmayan sığırdan elde edilen PBM, *T. parva* DNA'ları ve su RLB'de herhangi bir reaksiyon göstermemiştir. Ayrıca, cyto b1 primer çiftinin duyarlılığı başka bir gen bölgesi olan 18S ssurRNA gen bölgesini çoğaltan RLB F/R primer çifti ile karşılaştırılmıştır. RLB F/R primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünleri önceki çalışmalarda belirtilen *Theileria/Babesia catchall*, *T. annulata*, *T. buffeli/orientalis* grubu, *Babesia bovis* ve *B. bigemina* türlerine özgü 5'-biotin ile işaretlenmiş yukarıda anlatıldığı şekilde membrana bağlanmış oligonükleotid probalar (Gubbels ve ark 1999, Georges ve ark 2001) kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapılan RLB sonucunda 18S PZR ürünlerinin duyarlılığı %10<sup>-3</sup> parazitemi olarak belirlenmiştir (Resim 3.A.5 (B), sıra 3) ve cytob1 RLB sonucunda aynı şekilde %10<sup>-9</sup> parazitemiye denk gelen sulandırmada daha düşük yoğunlukta, özgül olamayan nokta gözlemlenmiştir. *B. bovis*, *B. bigemina* ve *T. buffeli/orientalis* grubundaki türleri belirleyen probalar ile hiçbir çapraz reaksiyon gözlenmemiştir (Resim 3.A.5 (B)). Her iki RLB sonucundada 10<sup>-9</sup> parazitemiye denk gelen sulandırmada gözlenen özgül olmayan, düşük yoğunluktaki noktanın DNA sulandırmaları esnasında kullanılan pipete yapışarak yüksek sulandırma esnasındaki pipetleme işleminde bu sulandırma basamağında kalmış olabilecek piroplasm ile enfekte eritrositlere bağlı olabileceği düşünülmüştür.



### A. Cytob1



### B. RLB-F/RLB-R



**Resim 3.A.5.** Türe özgü oligonükleotid problar membrana yatay olarak, PCR ürünleri ise dikey olarak konulmuştur. Yatay, 1 ile 10 arasında (1 ve 10 dahil) %0.1'den başlayıp %10<sup>-10</sup>'a kadar devam eden on katlı sulandırma örnekleri; 11'e enfekte olmayan sığır PBM; 12'ye *T. parva*; (-), negatif kontrol, su; (+), *T. annulata* pozitif kontrol. Dikey, (1) *T. annulata* cytochrome b genine özgü 5'-biotin ile işaretlenmiş oligonükleotid prob; (2) *Theileria* ve *Babesia* türlerinin hepsine ortak olan kontrol probu; (3) *T. annulata*'ya özgü oligonükleotid prob; (4) *T. buffeli*'ye özgü oligonükleotid prob; (5) *B. bovis*'e özgü oligonükleotid prob; (6) *B. bigemina*'ya özgü oligonükleotid prob. <sup>a</sup>; Gubbels ve ark. (1999) ile Georges ve ark. (2001) tarafından daha önceki çalışmalarda kullanılmış problar.

Sonuç olarak cyto b1 ve 18S PZR ürünlerinin RLB hibridizasyonu sonundaki duyarlılıkları sırası ile %10<sup>-6</sup> (0.1 piroplasm/μl kan) ve %10<sup>-3</sup> (100 piroplasm/μl kan) parazitemi olarak belirlenmiştir. Bu tabloda, cyto b1 primer çiftleri kullanılarak yapılan RLB hibridizasyonunun ethidyum bromid ile boyanan agaroz jel elektroforezine göre 100 kez ve 18S RLB hibridizasyonuna göre 1000 kez daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, cyto b1 PZR ürünlerinin ethidyum bromid ile boyalı agaroz jel elektroforezinin 18S RLB hibridizasyonuna göre 10 kez daha duyarlı olduğu belirlenmiştir

**Çizelge 3.A.6.** Cyto b1 primer çifti ve daha önceki çalışmalarda *T. annulata* enfeksiyonunun teşhisinde kullanılan gen bölgeleri ile elde edilen duyarlılık sonuçları

Hedef gen	Primer çiftleri	Tespit sınırı (parazit / µl kan)	Kaynak
30 kDa major merozoite yüzey antijen geni Tams-1	N516/N517	2–3 (% 48 x 10 <sup>-6</sup> parazitemi)	d'Oliveira ve ark., 1995
30 kDa major merozoite yüzey antijen geni Tams-1*	Tams1-T3/Tams1-T5 <sup>a</sup> Tams1F/Tspms1R <sup>b</sup>	1 (% 10 <sup>-5</sup> parazitemi)	Kirvar ve ark., 2000
18S ssu rRNA	RLB-F/RLB-R	3 (% 10 <sup>-6</sup> parazitemi)	Gubbels ve ark., 1999
ssu rRNA	989-1347 <sup>c</sup>	1 <sup>d</sup>	Ilhan ve ark., 1998
HSP70 proteinini kodlayan gen	<i>T. annulata</i> sense/ <i>T. annulata</i> -antisense	Saptanmamıştır	Shayan ve ark., 1998, 2005
Beta-tubulin geni	F34/R323 <sup>e</sup> F79/R206 <sup>b</sup>	Saptanmamıştır	Caccio ve ark., 2000
Sitokrom b geni	PICB-D1/PICB-D2	Saptanmamıştır	Criado ve ark., 2006
Sitokrom b geni	Cyto b1	1 <sup>f</sup>	Bu tez

(\*); Gen bölgesinin çoğaltılmasında nested PCR yöntemi kullanılmıştır.

(<sup>a</sup>); Katzer ve ark (1998) tarafından belirlenen primer çifti, nested PCR'ın ilk kısmında kullanılmıştır.

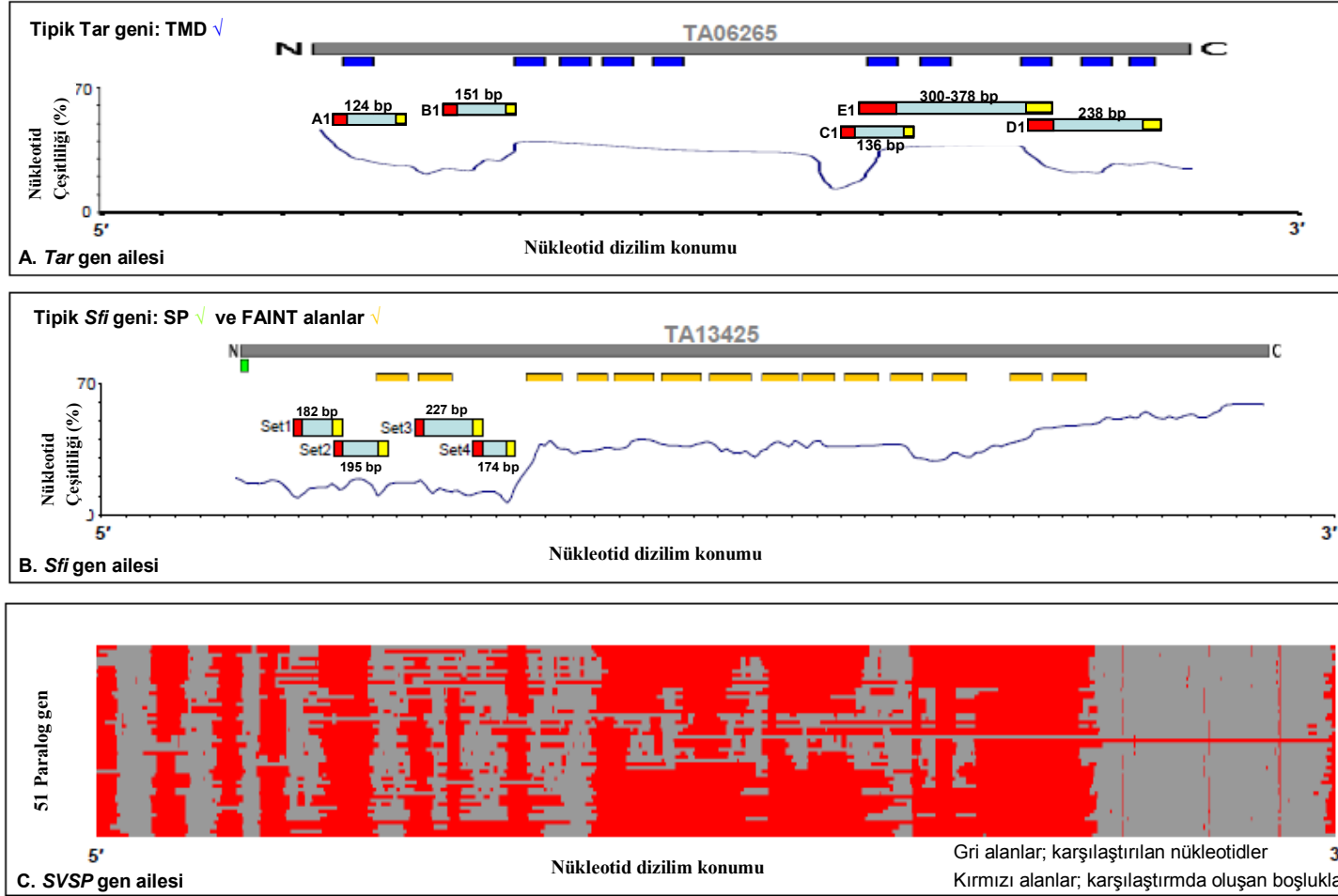
(<sup>b</sup>); Nested PCR'ın ikinci aşamasında kullanılan primer çifti.

(<sup>c</sup>); Allsopp ve ark (1993) tarafından belirlenen primer çifti.

(<sup>d</sup>); 4 µl kanda 1 paraziti tespit edebilmektedir.

(<sup>e</sup>); Caccio ve ark. (2000) tarafından belirlenen primer çifti nested PCR'ın ilk kısmında kullanılmıştır

(<sup>f</sup>); 10 µl kanda 1 paraziti tespit edebilmektedir.



**Şekil 3.A.7.** Üç farklı çoklu kopyalı gen ailesine ait paralog nükleotid dizilimlerin karşılaştırılması. Yüzde nükleotid çeşitliliği DnaSP programı kullanılarak her gen ailesini ifade eden paralog nükleotidler için ayrı ayrı belirlenmiştir. (A) *Tar* gen ailesine özgü primerler tasarlanması amacıyla karşılaştırılan 25 paralog gen ve tasarlanan primer bölgeleri. TA06265 tipik bir *Tar* genini ifade etmekte, mavi alanlar gen üzerinde yer alan trans membran bölgeleri belirtmektedir. (B) *Sfi* gen ailesine özgü primerler tasarlanması amacıyla karşılaştırılan 8 paralog gen ve daha fazla korunmuş olan N-terminal bölgeden tasarlanan primerler. TA13425 tipik bir *Sfi* genini ifade etmekte, turuncu renkli alanlar gen ailesine ait paralog genlerin çoğunda bulunan FAINT alanları ifade etmektedir. (C) *SVSP* gen ailesinde yer alan 51 paralog genin birbirleri arasında yapılan karşılaştırması. Gri alanlar; karşılaştırılan nükleotidleri, kırmızı alanlar ise; oluşan boşlukları ifade etmektedir.

### 3.A.3. Tartışma

Sığırlarda enfeksiyona yol açan *Theileria* türleri arasında ekonomik açıdan en önemlilerini *T. parva* ve *T. annulata* türleri oluşturmaktadır (Uilenberg 1981). Tropikal theileriosisin epidemiyolojisini belirlemek amaçlı mikroskopik bakıya dayalı çalışmalar sığırlarda eş zamanlı olarak görülen ve az patojen olan bazı *Theileria* türlerinin varlığı sebebiyle hastalığın yaygınlığı hakkında kesin sonuçlar verememektedir. Bunun yanında, PZR gibi moleküler yöntemler ile karşılaştırıldığında mikroskopik bakının duyarlılığı daha düşüktür. *T. buffeli/orientalis* grubundaki türler tüm dünyada sığırlarda yaygın olarak görülmekte ve doğal şartlar da bu gruptaki türler ile *T. annulata*'nın ayırımının yapılması önem taşımaktadır. Her ne kadar türlerin coğrafik dağılımı, etkeni taşıyan vektörler ile piroplasm ve şizont aşamasında görülen morfolojik farklar etkenlerin ayırımında yardımcı olsa da bu türlerin sadece morfolojik bakıyla ayırımı oldukça zordur. Vektör keneler eş zamanlı olarak farklı *Theileria* türlerine konakçılık yapabilmekte ve hastalıktan şüphe edilen hayvanlarda *Theileria* ile enfekte kenelerin belirlenmesi o hayvanın tropikal theileriosis ile enfekte olduğu anlamına gelmemektedir.

Hali hazırda bazı parazit türlerinin genomik dizilimlerinin belirlenmiş olması ve PZR gibi moleküler tekniklerin varlığı sayesinde, saha şartlarında hayvanlardan toplanan kan örnekleri içinde bulunan küçük miktarlardaki parazite ait DNA'lar belirlenebilmektedir (Bishop ve ark 1992, Fahrimal ve ark 1992, Russomando ve ark 1992, Tanaka ve ark 1993). *T.annulata* enfeksiyonlarının belirlenmesinde tanı amaçlı yapılan PZR testlerinde kullanılan primer çiftlerinin türe özgü ve yüksek duyarlılığa sahip olması önemlidir. PZR'unun performansı çoğaltılacak olan gen bölgesinin ilgili genomdaki sayısı ile orantılıdır. Bu açıdan bakıldığında çoğaltılacak hedef gen bölgesinin çoklu kopya sayısına sahip genlerden seçilmesi mevcut PZR'unun duyarlılığını arttırmak amaçlı izlenebilecek bir yol olabilir (Criado ve ark 2006). Yapılan çalışmalarda, Tams-1, HSP70, beta-tubulin, 18S ssu rRNA ve mitokondriyal sitokrom b genleri *T. annulata*'nın PZR ile teşhisinde kullanılmıştır (d'Oliveira ve ark 1995, Kırvar ve ark 2000, Shayan ve ark 1998, Caccio ve ark 2000; Gubbels ve ark 1999, Criado ve ark 2006). Parazite ait dört farklı kromozom tarafından kodlanan bu genler arasında, sadece 18S ssu rRNA geni *B. bovis* ve *T. parva* gibi diğer bazı apikompleksa parazitlerine benzer şekilde (Dalrymple 1990, Kibe ve ark 1994) çoklu kopyaya ( $\approx 2-3$  kopya/genom) sahip olduğu düşünülmektedir. 18S ssu rRNA geni haricindekiler genler ise haploid parazit genomunda tek kopyalı gen bölgeleridir. Bilinen tüm *Theileria* ve *Babesia* türlerinin 18S ssu rRNA genlerini eş zamanlı olarak PZR ile çoğaltılması ve takiben PZR

ürünlerinin farklı türlerin 18S ssu rRNA geninde görülen değişken bölgelerine özgü oligonükleotid problemlerin bağlı olduğu membrana blotlanarak RLB hibridizasyon testi ile belirlenmesi (Gubbels ve ark 1999) son yıllarda yapılan çalışmalarda *Theileria* ve *Babesia* türlerinden kaynaklanan enfeksiyonların belirlenmesinde en sık kullanılan yöntem haline gelmiştir. Yaygın kullanım alanına sahip olmasına karşın 18S genini çoğaltmada kullanılan primer çiftleri eş zamanlı oluşan enfeksiyonların tespitinde türlere ait gen bölgesinin çoğaltılması esnasında yarışmalı olarak ilgili gen bölgesine bağlanmakta ve bu da enfeksiyona yol açan farklı türlerin belirlenmesinde testin duyarlılığını olumsuz yönde etkilemektedir (Kibe ve ark 1994, Oura ve ark 2004).

Çoklu kopya sayısına sahip gen bölgeleri açısından incelendiğinde *T. annulata* genomunda, *T. parva* genomunda bulunan *Tpr* genlerinin ortoloğu olan ve 93 gen bölgesinden oluşan *Tar* genleri, içinde çok sayıda 'FAİNT Domain' adı verilen alanlar bulunan ve 64 genden oluşan *Sfi* sub-telomerik genleri ve SVSP genleri (50 genden oluşan) olmak üzere üç tane çoklu kopyaya sahip gen ailesi bulunmaktadır (Pain ve ark 2005, Lau 2009). Çoklu kopya sayısına sahip *Sfi* gen ailesini çoğaltmak için tasarlanan primer çiftleri ile PZR sonuçları bize bu gen ailesinin *T. annulata*'nın farklı izolatları arasında yüksek oranda farklılığa sahip olduğunu göstermiştir. *Tar* gen ailesini çoğaltmada kullanılan primer çiftleri ile yapılan PZR sonuçlarında kimi izolatlarda hiçbir çoğalma elde edilememesi de bu ailede bulunan gen bölgelerinin enfeksiyonun teşhisinde kullanımı olanaksız hale getirmiştir. Yüzde nükleotid çeşitliliğin belirlenmesi için yapılan DnaSP bilgisayar programı kullanılarak yapılan analizlerde *Sfi* ve *Tar* gen ailelerinde yer alan paralog genler arasında gözlenen nükleotid polimorfizmi ile özellikle SVSP ailesindeki paralog genler arasında görülen yüksek düzeyde heterojenite ve uzunluk farklılıkları (Şekil 3.A.7) çoklu kopyaya sahip genlerin yerine daha az polimorfik bölgelerin seçilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. *T. parva* genomunda yer alan SVSP proteinlerinin amino asit düzeyinde C ve N terminal kısımlarında korunmuş olduğu belirtilmesine (Schmuckli-Maurer ve ark 2009) karşın, yapılan analizlerde *T. annulata* genomunda yer alan SVSP genlerinin nükleotid düzeyinde oldukça polimorfik olduğu belirlenmiştir.

Sitokrom b geni, mitokondriyal genomda bulunan tek kopyalı bir gen olmasına karşın, her mitokondriyonda 2–10 mitokondriyal genom bulunmaktadır (Wiesner ve ark 1992). Bununla birlikte, her hücrede bulunan mitokondriya sayısı türler ve dokular arasında farklılık gösterdiği bilinmektedir (Bruce ve ark 1994, Voet ve ark 2006). *T. annulata*'nın mitokondriyal genomunda linear, 6.5 kb büyüklüğünde, çok sayıda *cyto b* kodlayan sitokrom b geni bulunmaktadır (Hall ve ark 1990, Megson ve ark 1991). *T. annulata*'nın farklı yaşam

dönemleri göz önüne alındığında, parazite ait sporozoitler tek mitokondriyon ihtiva etmektedir (Jura ve ark 1983), ancak tek mitokondriyonun içinde bulunan mitokondriyal DNA sayısı bilinmemektedir. Bununla birlikte, sporozoit dönemi omurgalı konak olan sığırlarda enfeksiyonun tanısında önem taşımamaktadır. Bunun dışındaki şizont ve piroplasm dönemlerinde bulunan mitokondriyon sayısı ya da her mitokondriyonda bulunan mitokondriyal DNA sayısı belirlenmemiştir. *T. sergenti* piroplasmalarının çok sayıda mitokondriya ihtiva ettiği gösterilmiştir (Uchida ve ark 1985). Eğer, *T. annulata*'da *T. sergenti*'ye benzer şekilde piroplasm dönemlerinde çok sayıda mitokondriya ihtiva ediyorsa, PZR'nda bu genin çoğaltılması taşıyıcı hayvanların tespitinde yararlı bir teşhis yöntemi olabilir.

Bu çalışmada, PZR ile çoğaltılan mitokondriyal sitokrom b geni tropikal theileriosis ile enfekte taşıyıcı ve hasta hayvanlarda *T. annulata*'nın özgül ve duyarlı olarak teşhisinde kullanılmıştır. Sığırların kanının bir mikrolitresinde  $10^7$  eritrosit olduğu farz edildiğinde (Bhannasir ve ark 1961) cyto b1 primer çifti kullanılarak yapılan PZR ethidyum bromid ile boyalı agaroz jel elektroforezinde bir  $\mu$ l kanda 10 piroplasmı tespit etmiştir. PZR'un duyarlılığı yapılan RLB hibridizasyonu ile bir  $\mu$ l kanda 0.1 piroplasma kadar artmıştır. RLB-F/RLB-R primer çifti kullanılarak çoğaltılan 18S ssu rRNA genine ait PZR ürünlerinin RLB hibridizasyonu bir  $\mu$ l kanda 10 piroplasm tespit edilebilmiş ve bu sonuçlar birbirleri ile karşılaştırıldığında cyto b1 PZR'nun *T. annulata*'nın teşhisinde 18S ssu rRNA geni çoğaltılarak yapılan PZR'na oranla 100 kez daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. *T. annulata*'nın PZR ile teşhisinde N516/N517 (d'Oliveira ve ark 1995) ve 989–1347 (Ilhan ve ark 1998) ve Tams1-T3/Tams1-T5 ile Tams1F/Tspms1R (Kirvar ve ark 2000) primer çiftleri kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar Çizelge 3.A.6'da verilmiştir. Buna göre Tams 1 genini çoğaltmada kullanılan N516/N517 (d'Oliveira ve ark 1995) primer çiftinin duyarlılığı bir  $\mu$ l kanda 2 – 3 parazit, ssu rRNA genini çoğaltmada kullanılan 989–1347 (Ilhan ve ark 1998) primer çiftinin duyarlılığı dört  $\mu$ l kanda bir parazit ve Tams genini nested PZR ile çoğaltmada kullanılan Tams1-T3 / Tams1-T5 ile Tams1F / Tspms1R primer çiftlerinin duyarlılığı bir  $\mu$ l kanda bir parazit olarak bulunmuştur. Bunlara ilaveten, sığırlarda hastalık oluşturan tüm *Theileria* ve *Babesia* türlerine ait 18S ssu rRNA genini çoğaltarak türe özgü oligonükleotid problarla hastalığa sebep olan etkenlerin ayırıcı tanısında kullanılan RLB hibridizasyon testinin *T. annulata* ile enfekte kan örnekleri kullanarak yapılan duyarlılık testi sonucunda 18S RLB hibridizasyonunun bir  $\mu$ l kanda üç parazite kadar tespit edebildiği belirlenmiştir (Gubbels ve ark 1999). *T. annulata*'nın teşhisinde HSP70 (Shayan ve Rahbari 2005, Shayan ve ark 1998), beta-tubulin (Caccio ve ark 2000) ve sitokrom b (Criado ve ark

2006) genleri kullanılarak yapılan PZR'da ilgili genlere özgü primer çiftlerinin duyarlılıkları belirlenmemiştir (Çizelge 3.A.6). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar daha önceki çalışmalar ile karşılaştırıldığında sitokrom b genini çoğaltmada kullanılan cyto b1 primer çifti Tams-1genini çoğaltan N516/N517 (d'Oliveira ve ark 1995) ve Tams1-T3/Tams1-T5 ile Tams1F/Tspms1R (Kirvar ve ark 2000), 18S ssu rRNA genini çoğaltan RLB F / R (Gubbels ve ark 1999) ve 989–1347 primer çiftlerine kıyasla *T. annulata*'yı daha duyarlı şekilde tespit etmiştir.

FTA kartları saha şartlarından toplanan kan örneklerinde bulunan patojen DNA'ların kolay ve güvenli şekilde saklanıp, nakledilmesinde kullanılan bir yöntemdir. FTA kartlarında bulunan kan örneklerindeki hedef DNA'nın PZR yöntemi ile duyarlı olarak belirlenmesi kimi zaman DNA ayırma kitleri kullanılarak hazırlanan DNA örnekleri ile elde edilen sonuçlara göre daha az duyarlılık gösterebilmektedir (Jefferies ve ark 2007). Bu çalışmada *T. annulata* ile enfekte hayvaların bilinen parazitemideki kanlarının, enfekte olamayan kan kullanılarak 10 katlı sulandırmaları damlatılarak hazırlanan FTA kartlarından yapılan PZR sonucunda, cyto b1 primer çifti disklerde beklenen 312 bp'lık ürünü çoğaltmamıştır. Kan örneklerinin FTA kartları üzerine dairesel olarak yayılması esnasında kullanılan kan örneğinde bulunan patojen ve konak DNA'ları filtre kağıdı üzerinde geniş bir alana rastgele yayılmaktadır. Bu filtre kağıtlarından kesilerek hazırlanan 2 mm çapındaki örnekler PZR'da hedef DNA olarak kullanılmaktadır. Kesilen 2 mm çapındaki disk FTA kartı üzerine uygulanan kan örneğindeki çok küçük bir bölümünü teşkil ettiği ve kan örneğindeki aranan türe ait parazitemi seviyesinin düşük olduğu olgularda PZR'da kullanılan diskte yeterli miktarda parazit materyali olma olasılığı belirgin oranda azalmaktadır. Bu çalışmada kullanılan disklerde PZR ile her hangi bir çoğalma görülmemesi bize hedef DNA miktarının belirnebilecek oranlardan daha düşük seviyelerde olduğunu göstermektedir. Ancak, yapılan bu varsayımın tam olarak doğrulanabilmesi için daha geniş parazitemi aralığına sahip kan örnekleri ile hazırlanmış FTA kartları kullanılması faydalı olacaktır.

Yapılan çalışmalarda, tek ve çok kopyalı gen bölgelerinin PZR ile parazit türlerinin teşhisinde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesinde tek kopyalı bazı gen bölgelerinin çoklu kopya sayısına sahip olanlara nazaran daha duyarlı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Oura ve ark 2004, Martins ve ark 2008). Bu amaçla kullanılan ve tek kopya sayısına sahip MeroI genini çoğaltmada tasarlanan primer çiftleri ile yapılan PZR sonucunda elde edilen sonuçlar bize MeroI geninin çoklu kopya sayısına sahip *Sfi* gen ailesini çoğaltmada kullanılan *Sfi* set2 primer çiftleri ile elde edilen PZR'na oranla daha düşük duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte daha önceki çalışmalarda kullanılan ve Tams-1 genini

çoğaltmada kullanılan N516/N517 primer çiftleri ile deneysel enfekte hayvandan elde edilen 10 katlı sulandırılmış DNA örnekleri kullanılarak yapılan PZR sonucu bize *Sfi* set2 primer çifti ile aynı duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir. Ancak yukarıda bahsedilen gen bölgelerini çoğaltmada kullanılan primer çiftleri sitokrom b genini çoğaltmada kullanılan cyto b1 primer çiftleri ile elde edilen sonuçlara kıyasla daha düşük duyarlılık göstermiştir.

Mitokondriyonda bulunan mtDNA'nın hem kendi içinde hemde diğer mtDNA'lar ile rekombine olduğu bilinmektedir. Rekombinasyon yoluyla çoğalan nükleer DNA'dan farklı olarak mtDNA farklı yaşam döngüleri arasında genelde çok az farklılık göstermektedir. Bu sebeple, mtDNA'da bulunan sitokrom b gen bölgesi farklı türler yada tek bir türün farklı grupları arasındaki genetik ilişkilerin incelenmesinde ve bunlar arasındaki filogenetik ilişkinin tespitinde kullanılabilir bir gen bölgesidir. Yapılan çalışmada, *T. annulata*'nın İspanya ve Türkiye izolatlarına ait sitokrom b genine ait allelik dizilimleri arasında yüksek oranda (%6) farklılık olduğu belirtilmiştir (Criado ve ark 2006). Bu çalışmada kullanılan tüm *T. annulata* izolatlarının başarılı olarak çoğaltılmış olması, cyto b1 primerlerinin hedef DNA üzerindeki bağlanma yerlerinin *T. annulata*'nın farklı izolatları arasında korunmuş bölgeler olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda, 312 bp'lık hedef bölgenin hem farklı coğrafik bölgelere ait izolatlarda hemde aynı bölgenin farklı izolatları arasında düşük oranda allelik farklılık göstermiştir (Şekil 3.A.6). Ancak, daha farklı coğrafik bölgelere ait allelerin incelenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, *T. annulata* enfeksiyonuna taşıyıcılık yapan ve vücutlarında düşük seviyede parazitemiye sahip hayvanların belirlenmesinde cyto b1 primer çiftleri özgül ve duyarlı şekilde kullanılmıştır. *T. annulata*'nın patojen olmayan *Theileria* türleri ve hayvanlarda eş zamanlı hastalık oluşturabilen diğer kan parazitlerinden özgül ayırımına olanak sağlamıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, sitokrom b geni kullanılarak geliştirilen PZR ile hastalığa taşıyıcılık yapan hayvanlar yüksek duyarlılıkla belirlenmiştir ve hastalığın görülmediği bölgelere endemik bölgelerden kontrolsüz hayvan hareketleri nedeniyle nakledilen hayvanların tespiti amacıyla kullanılabilirliği görülmüştür. Bunun yanında cyto b1 primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin RLB hibridizasyonu sonucunda elde edilen yüksek duyarlılık (bir µl kanda 0.1 piroplazma) göz önüne alındığında, sığırlarda eş zamanlı olarak görülen *Theileria* ve *Babesia* türlerinin sitokrom b gen dizilimleri belirlendikçe hali hazırda *Theileria* ve *Babesia* türlerinin RLB hibridizasyonu ile teşhisinde kullanılan 18S ssu rRNA geninin yerini alabileceği görülmektedir. Mitokondriyal sitokrom b geni *T.annulata*'nın epidemiyolojik çalışmalarındaki potansiyel kullanım alanına ek olarak, filogenetik çalışmalarda (Criado ve ark 2006), muhtemel ilaç direnci (buparvaquone) ve hücre siklusu



alışmalarını da içine alan geniş bir kullanım alanına sahiptir. Elde edilen sonuçlar, yukarıda belirtilen potansiyel çalışma alanları için n bir çalışma olarak da değerlendirilebilir.

### 3.3.. *Theileria annulata*, *Babesia bovis* ve *Anaplasma marginale* Türlerinin Sığırlarda Çoklu (Multipleks) PZR Yöntemi ile Eş Zamanlı Teşhisi

Tropik ve subtropik bölgelerde kene kökenli protozoal hastalıklar, sığır çiftliklerinin idaresi ve sürü sağlığı yönünden önemli yer tutarlar (Jongejan ve Uilenberg 1994). Bu hastalıklar arasında yer alan tropikal theileriosis, bovine babesiosis ve anaplasmosis sığırlarda yalnızca en sık rastlanan türler olmayıp aynı zamanda en fazla ekonomik kayba yol açanlardır (Gubbels ve ark 1999, Georges ve ark 2001). Daha önceki kısımda anlatıldığı üzere tropikal theileriosis protozoal parazit olan *T.annulata* tarafından oluşturulan ve *Hyalomma* soyuna bağlı birçok kene türü tarafından nakledilen bir hastalıktır (Robinson 1982). Sığırlarda görülen diğer bir protozoal hastalık olan babesiosis *Babesia bigemina* ve *Babesia bovis* türleri tarafından oluşturulan ve tüm dünya genelinde yaygın olarak görülen bir hastalıktır (Callow 1984). Hastalığa yol açan her iki tür *Babesia* etkeninin asıl konakçılığını *Boophilus* keneleri yapmakta, ancak etkenler *Rhipicephalus eversi*, *R. bursa*, *Ixodes ricinus* ve *I. persulcatus* türü keneler tarafından da nakledilebilmektedir (Friedhoff 1988, Estrada-Pena ve ark 2004). *Babesia bovis*, *B. bigemina* türüne kıyasla sığırlarda daha şiddetli hastalık tablosu oluşturmaktadır (Callow 1984). Bovine anaplasmosis, evcil ve yabani ruminantlarda görülen ve rickettsiya soyuna bağlı organizma olan *Anaplasma marginale* tarafından oluşturulan bir hastalıktır. Hastalığa Kuzey ve Güney Amerika, Afrika, Karayipler, Rusya, Akdenize kıyısı olan Avrupa ülkeleri ile Orta ve Uzakdoğu' yuda içine alan geniş bir coğrafyada rastlamak mümkündür. Hastalık sığırlara biyolojik yolla ixodid keneler tarafından, mekanik olarak kan emen sinekler yada kullanılan enfekte materyal ile bulaşabilmektedir (Kocan ve ark 2000).

Kene kökenli hastalıklar ile direk ilişkili olarak hayvanlarda ve dolayısıyla işletmelerde oluşan kayıpları ölüm, verim düşüklüğü, veteriner tanı ve tedavi giderleri ile kene mücadelesi için yapılan masraflar oluşturmaktadır (Jonsson ve ark 2008). Kene kökenli hastalıklara bağlı olarak hayvanlarda görülen ateş, iştahsızlık, kilo kaybı, süt veriminde azalma, anemi ve ilerlemiş olgularda sarılık gibi klinik belirtiler enfeksiyonun ayırıcı tanısına olanak sağlamayan ve genelde yaygın olarak görülen ortak klinik bulgulardır. Kene kökenli hastalıklar hayvanlarda genelde eş zamanlı olarak görülürler (Gubbels ve ark 1999, Georges ve ark 2001). Saha şartlarında hayvanlarada eş zamanlı görülen bu hastalıkların teşhisi genelde klinik bulgulara dayandırılmakta ve hastalığın erken dönemlerinde ve hastalığı atlatmış olan hayvanlarda ayırıcı teşhisleri yapılamamaktadır. Sığırlarda eş zamanlı hastalık oluşturan etkenlerin laboratuvar teşhisinde en sık kullanılan yöntem perifer kandan yada

şüpheli lenf yumrularından alınan biyopsi örneklerinden (*T. annulata*'nın teşhisi için) hazırlanan sürme preparatların giemsa ile boyandıktan sonra etkenlere ait formların sırasıyla eritrositler ve lenfositler içersinde aranması yoluyla yapılmaktadır (Callow 1984, Anon 1997). Bu hastalıklarda görülen ortak özellik hastalığı atlatan hayvanlarda reenfeksiyonlara karşı direnç geliştirmekte ve bu türlü hayvanlar hastalık etkenlerini uzun süre vücutlarında taşımaktadırlar (Neitz 1957, Callow 1984). Özellikle *A. marginale* enfeksiyonlarını atlatan hayvanlar etkene ömür boyu taşıyıcılık yapmaktadırlar (Kocan ve ark 2000). Taşıyıcı hayvanların klinik olarak hasta olmayanlardan ayırımı yapılamamakta ve bu hayvanların tanısında kullanılan mikroskopik yöntemler etkenlerin belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır (Figueroa ve ark 1993, İlhan ve ark 1998). Taşıyıcı hayvanlar hastalığın vektör kenelere nakilde rezervuar rolü üstlenmelerinden dolayı epidemiyolojide önem arz etmektedir.

*Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* etkenlerinin hayvanlarda teşhisinde kullanılan IFA testi gibi serolojik yöntemlerde türler arasında görülen çapraz reaksiyonlar (Burrige ve ark 1974, Kiltz ve ark 1986, Kocan ve ark 2000, Molad ve ark 2006) hastalıkların ayırıcı tanısında özgül sonuçlar elde edilmesini engellemektedir. Düşük parazitemiye sahip taşıyıcı hayvanların vücutlarıdaki antikor seviyesi zamanla azalarak tespit edilemeyecek seviyelere kadar gerilemekte ve serolojik olarak negatif sonuç veren bu tür hayvanlar halen daha vücutlarında etkeni taşımaktadırlar. Bu da hastalıkların kontrolünde önemli kayıplara yol açmaktadır. Örnek olarak; serolojik olarak negatif sonuç veren taşıyıcı bir hayvan hastalığın görülmediği bir bölgeye götürüldüğünde bu bölgedeki potansiyel taşıyıcı kenelere hastalığı naklederek ilerleyen dönemlerde oluşacak salgınların ana kaynağını oluşturacaktır.

PZR ve RLB gibi PZR tabanlı hibridizasyon testleri sığırlarda görülen kene kökenli hastalıkların teşhisinde özgül ve duyarlı olarak kullanılmaktadır (Gubbels ve ark 1999, Georges ve ark 2001, d'Oliveira ve ark 1995, İlhan ve ark 1998, Kirvar ve ark 2000). *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* kaynaklı enfeksiyonların tespitinde kullanılan PZR testi her etkenin teşhisi ayrı ayrı yapılmakta ve sonuç olarak saha şartlarında sığırlardan toplanan kan örneklerinde eş zamanlı görülen bu etkenlerin teşhisinde yorucu, uzun zaman alan ve pahalı bir test haline gelmektedir. Hastalık etkenlerinin eş zamanlı olarak teşhisinde kullanılan PZR tabanlı RLB hibridizasyon tekniği, tekli PZR testi kullanıldığında meydana gelen bu sorunların giderilmesini sağlamıştır. RLB hibridizasyonu, hastalığa yol açan türlerde ortak bulunan gen bölgesini PZR ile çoğaltılıp bunu takiben yapılan blotlama ile her türün ayrı ayrı teşhis edilmesini sağlayan iki aşamalı bir testtir. RLB hibridizasyonu her ne kadar türlerin eş zamanlı olarak teşhisine olanak sağlasada testin yapılmasında deneyimli elemana ve özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Hayvanlarda ekonomik kayıplara yol açan bu hastalık

etkenlerinin eş zamalı olarak belirlenmesi için yapılan epidemiyolojik çalışmalarda verimli ve daha ucuz bir yöntem kullanılması önemlidir.

PZR' nun farklı bir şekli olan çoklu polimeraz zincir reaksiyonu (Multipleks PZR) tek yada daha fazla organizmaya ait bir veya daha fazla sayıdaki hedef bölgenin her birine özgü primer çiftleri kullanılarak tek bir reaksiyon ile etkili ve kısa zamanda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir (Markoulatus ve ark 2002, Henegariu ve ark 1997, Edwards ve Gibbs 1994). Multipleks PZR yöntemi tek bir reaksiyonda eş zamanlı olarak bir çok türün teşhisine olanak vermesi açısından PZR'na göre büyük bir üstünlük sağlamıştır. Chamberlain ve ark. tarafından 1988'de genlerdeki silinmiş alanların belirlenmesi amacıyla tanımlanan bu yöntem daha sonraki yıllarda mutasyon ve farklılıkların belirlenmesi (Shuber ve ark 1993, Rithidech ve ark 1997), kantitatif analizler (Zimmermann ve ark 1996), ters yönlü transkripsiyon (RT) PZR (Crisan 1994) gibi bir çok DNA analiz yönteminde kullanılmıştır. Saha şartlarında görülen viral (Heredia ve ark 1996, Markoulatos ve ark 2000), bakteriyel (Hendolin ve ark 1997, Courtney ve ark 2004) ve kan parazitleri ile nematodlarıda içine alan paraziter (Zarlenga ve ark 2001, Harris ve ark 1998, Figueroa ve ark 1998, 1996, 1993,) kökenli bir çok hastalığın tespitinde multipleks PZR yönteminden yararlanılmıştır.

Bu kısımda sığırlarda aynı anda hastalık oluşturabilen ve yetiştiricilikte önemli ekonomik kayıplara yol açan *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* türlerinin eş zamanlı teşhisinde kullanılmak üzere multipleks PZR yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda multipleks PZR testinin geliştirilmesinde izlenen yol, testin özgüllüğü ve duyarlılığının belirlenmesi ile saha şartlarında uygulanabilirliği anlatılacaktır.

### 3.3.1. Gereç ve Yöntem

#### 3.3.1.1. Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali

Bu çalışmada, kullanılacak primer çiftlerinin özgüllüklerinin tespiti ve multipleks PZR' un optimizasyonu amacıyla *T. annulata*'nın 12 farklı izolatu (Ankara/D7, Tunus, İran, Sudan, Mısır, İsrayil, Hindistan, Aydın), *T. parva* Kenya, *T. sergenti* Japoya, *T. lestoquardi* İran, *B. bovis*' in Meksiko, Güney Afrika, Avustralya, İsrayil ve Türkiye'yi içine alan farklı bölgeleri temsil eden dokuz izolatu, *B. bigemina* Kenya, *T. equi*, *A. marginale*'nin üç farklı izolatu, *A. phagocytophila* ve *A. centrale* Aydın olmak üzere toplam 15 *Theileria*, 11 *Babesia* ve beşde *Anaplasma* soyuna bağlı olmak üzere toplam 31 adet DNA örneği kullanılmıştır. Kullanılan parazit örneklerine ait detaylı bilgi Çizelge 3.A.1'de verilmiştir.

Ayrıca *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* enfeksiyonlarının endemik olarak görüldüğü Aydın ili ve buna bağlı ilçelerdeki hayvanlardan multipleks PZR' nun saha şartlarında uygulanabilirliğini değerlendirmek amacıyla kan örnekleri toplanmıştır. Toplanan kan örneklerinden Promega Wizard Genomic DNA ayırma kiti (Madison, WI, USA) kullanılarak DNA'lar çıkartılmıştır. Ayrılan DNA örnekleri 35 µl rehidrasyon solüsyonu ile sulandırılarak kullanılmalarına kadar -20°C'de saklanmıştır.

#### 3.3.1.2. Çalışmada Kullanılan Gen Bölgeleri ve GenBank Ulaşım Numaraları

*Theileria annulata*, *A. marginale* ve *B. bovis* türlerinin eş zamanlı olarak multipleks PZR ile teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan primerlere ait gen bölgeleri ve bunların GenBank numaraları aşağıda belirtildiği şekildedir. *T. annulata*'nın belirlenmesinde önceki kısımda anlatılan sitokrom b genini çoğaltan cyto b1 primer çifti kullanılmıştır (3.2.1. Gereç ve Yöntem). *A. marginale* türünün multipleks PZR ile teşhisinde kullanılacak olan gen bölgesinin belirlenmesinde bu türe ait major yüzey protein (*mSP*) gen ailesine ait GenBank numaraları; *AY84153*, *M59845*, *CP000030.1* ve *AF527422-27* şeklindedir. Ayrıca *A. marginale*'nin genomunda bulunan ORFX ve ORFY genleri ile *B. bovis*'in teşhisinde kullanılacak primer çiftlerinin tasarlanmasında bu türe ait değişken eritrosit yüzey antijen-1 beta alt ünitesi ile 40S ribozomal proteinini kodlayan gen bölgeleri, ABC taşıyıcı gen ailesi, değişken eritrosit yüzey antijen-1 alfa alt ünitesi ve variant değişken eritrosit yüzey antijen -1a kodlayan gen bölgelerine ait nükleotid dizilimleri ICTTD-3, Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust ve GeneDB Org. ortaklığında hazırlanan ve *B. bovis*'inde dahil olduğu birçok patojen türün genom dizilimleri içinde barındıran *Tick-Borne Pathogen Genome Resources* CD-ROM (Version 1)'undan elde edilmiştir.

### 3.3.1.2. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Tasarlanması ve Bunlara ait Nükleotid Dizilimleri

*Anaplasma marginale* ve *B. bovis* türlerini multipleks PZR ile çoğaltmada kullanılacak primerlerin tasarlanmasında kullanılan çoklu kopyaya sahip gen aileleri mevcut genom veri tabanlarından biyoinformatik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Çoklu kopyaya sahip bu gen ailelerini çoğaltacak primer çiftleri, ilgili genlerin kendi arasında clustal X (1.83) bilgisayar programı (Thompson ve ark 1997) kullanılarak her gen ailesi kendi içinde olacak şekilde bir biri arasında karşılaştırılıp gen ailesi içinde korunmuş bölgeler belirlenerek tasarlanmıştır (Çizelge 3.B.1).

*Theileria annulata*'nın multipleks PZR ile teşhisinde mitokondriyal genomda tek kopyalı olduğu bilinen mitokondriyal sitokrom b genini çoğaltan cyto b1 primer çifti (İleri yönlü: 5'-ACT TTG GCC GTA ATG TTA AAC-3'/Geri yönlü: 5'-CTC TGG ACC AAC TGT TTG G-3') önceki kısımda anlatıldığı şekilde (3.2.1. Gereç ve Yöntem) *T. annulata* sitokrom b genine özgü 312 bp'lık kısmı çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır.

*Anaplasma marginale*'nin multipleks PZR ile teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan primer çiftleri bu türün genomunda bulunan major yüzey protein (msp) gen ailesi ile genomda 12 ve altı kopyaya sahip sırasıyla ORFX ve ORFY genlerinde bulunan genlerin birbirleri ile karşılaştırılması ile tasarlanmıştır.

Biyoinformatik yöntemler kullanarak *B. bovis* genomunda belirlenen dört kopyalı 40S ribozomal protein S17 geni, beş kopyalı ABC taşıyıcı gen ailesi, 41 kopyalı değişken eritrosit yüzey antijen-1 beta alt ünitesini kodlayan gen ailesi, 72 kopyalı değişken eritrosit yüzey antijen-1 alfa alt ünitesini kodlayan gen ailesi ile beş kopyaya sahip değişken eritrosit yüzey antijen-1a proteinini kodlayan gen bölgeleri belirlenmiş ve bu genler kendi aralarında clustal X bilgisayar programı kullanılarak ilgili genleri çoğaltmada kullanılacak primer çiftleri tasarlanmıştır.

*Theileria annulata*, *A. marginale* ve *B. bovis* türlerinin eş zamanlı olarak multipleks PZR ile teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan primer çiftlerinin çoğaltacağı gen bölgelerine olan özgüllükleri ve gen üzerinde primerlerin tasarlandığı bölgelerin tekrarlı dizilim gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla her primer çifti nükleotid blast programı kullanılarak NCBI veri tabanında kontrol edilmiştir (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Her primere ait GC (G; guanin, C; sitozin) içeriği o primerin hedef gen bölgesine bağlanmadaki kararlılığını belirten bir parametredir.  $T_m$  değerleri ise DNA ipliğinin yarısının çiftli heliks (double-helical state) durumunda diğer yarısında gelişigüzel yumak durumunda olduğu ısı

olarak tanımlanmaktadır (John 1998). Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerlerin  $T_m$  değerleri reaksiyonun bağlanma aşamasındaki ısı değerinden belirgin olarak fazla olduğunda kullanılan primer DNA üzerindeki özgül olmadığı bölgelere yanlış bağlanıp DNA zincirini hatalı olarak çoğaltmaktadır.  $T_m$  değerleri reaksiyonun bağlanma aşamasındaki ısı değerinden belirgin olarak düşük primerler ise hedef DNA'ya bağlanıp onu çoğaltamamaktadır. Bu amaçla, tasarlanan primer çiftlerine ait GC (G; guanin, C; sitozin) içerikleri,  $T_m$  değerleri, primerin kendi üzerinde (Örnek; loop oluşumu) bağlanma olasılıkları ile primer–dimer (aynı yada farklı iki primerin bağlanmaları için tasarlandıkları gen bölgesi haricinde birbirleri ile bağlanması) oluşturma potansiyelleri gibi multipleks PZR' nu olumsuz etkileyebilecek parametreler oligonükleot analiz bilgisayar programı ([www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware](http://www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware)) kullanılarak biyoinformatik yolla değerlendirilmiştir.

**Çizelge 3.B.1.** *T. annulata*, *B. bovis* ile *A. marginale* türlerinin multipleks PZR yöntemi ile teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan primer çiftleri

Gen adı (kopa sayısı / genom)	Primerin ismi	Dizilim <sup>a</sup>	GC içeriği (%) <sup>b</sup>	Tm (°C) <sup>b</sup>	Çoğaltılan bölge (bp)	Özgüllük	Kaynak
VESA-1,beta alt ünites, (41)	bovar1	For; AGGCCCCCTCCATGGGATGTA Rev; CCAGCTCTATTTCCCTGAGG	61.9 52.6	63.7 56.7	127	<i>B. bovis</i> 'e özgü	Bu tez
40S ribozomal protein (4)	bov40S	For; GTGCGTGGCATTTCATTGAAGC Rev; TCAGAAACGCTGGTGAACG	50 52.6	60.3 56.7	204	" "	" "
VESA-1,alfa alt ünitesi (72)	<sup>c</sup> bovar2A	For; CAAGCATAACAACCAGGTGG Rev; ACCCCAGGCACATCCAGCTA	52.6 60	56.7 61.4	166	" "	" "
	bovar2B	For; CAAGCATAACAACCAGGTGG Rev; CTATCATG(CT)*TCCATGGGG	52.6 50	56.7 53.7	188	" "	" "
ABC taşıyıcı ailesi (5)	bovABC	For; CACGTGTCATTTCCTGAGC Rev; CAACGGTTCTCCAGTTGT	50 50	53.7 53.7	124	" "	" "
VESA-1a (5)	bovar3A	For; GGACCTACTGTATGACGCC Rev; TGCCACCCAACCCACTTCT	57.9 57.9	58.8 58.8	243	" "	" "
	bovar3B	For; ATGGGATGTACGCCAATGGG Rev; AGCTGGTAGAAGCAGTGG	55 55.6	59.4 56	103	" "	" "
MSP 1B	MAR1bA	For; GAGTACCTTCACAGTAACG Rev; GCACACGTCATGATGCCACC	47.4 60	54.5 61.4	92	<i>A. marginale</i> 'ye özgü	" "
	MAR1bB1	For; CAGCTCAAGCTACCTGGG Rev; CCCTTGAGCGATGTCTGTG	61.1 57.9	58.2 58.8	382	" "	" "
	<sup>c</sup> MAR1bB2	For; GCTCTAGCAGGTTATGCGTC Rev; CTGCTTGGGAGAATGCACCT	55 55	59.4 59.4	265	" "	" "
ORFX (12)	MARorfX	For; CAGCGACTGTTGTTATATG Rev; TTAGCCATAAGCTTACCAGC	42.1 45	52.4 55.3	181	" "	" "
ORFY (6)	MARorfY	For; ATGGTAGCCCTGATATGG Rev; CCTATGGCTGTACA(TC)*ACAACC	50 61.9	53.7 63.7	231	" "	" "
sitpkrom b (tek kopya / mtDNA)	<sup>c</sup> cytob1	For; ACTTTGGCCGTAATGTTAAAC Rev; CTCTGGACCAACTGTTTGG	38.1 52.6	54 56.7	312	<i>T. annulata</i> 'ya özgü	" "

(<sup>a</sup>); Dizilimin 5'-3' yönü verilmiştir, (<sup>b</sup>); Tüm primer çiftleri MWG Biotech, Almanya firması tarafından sentezlenmiştir, (<sup>c</sup>); İlgili geni multipleks PCR yöntemi ile çoğaltmada kullanılan primer çiftini belirtir, (\*); pozisyondaki sitozin ya da tirozin bazlarını belirtir.



### 3.3.1.3. Tasarlanan Primerlerin Tekli ve multipleks PZR ile Değerlendirilmesi

Multipleks PZR’da kullanılacak primer çiftlerinin belirlenmesi amacıyla aşama aşama uygulanan bir multipleks PZR yöntemi (Henegariu ve ark 1997) kullanılmıştır. İlk aşamada, tasarlanan primer çiftlerinin (Çizelge 3.B.1) özgülükleri ve etkinlikleri ayrı ayrı temel bir PZR ile Çizelge 3.A.1’de belirtilen DNA örnekleri kullanılarak aynı koşullar altında değerlendirilmiştir. Temel PZR, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin ve her deoksinükleotid trifosfattan (dNTP) 250µM, 1 ünite Ampli *Taq* DNA polimeraz (Applied Biosystems, Tokyo, Japonya), tasarlanan her primer çiftinden 10 µM (Çizelge 3.B.1) ve her türe ait DNA örneklerinden 2 µl (Çizelge 3.A.1) olacak şekilde 50 µl son hacimde yapılmıştır. Reaksiyon Techne TC-512 marka otomatik termal sikluslu makinede gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 94°C’de 3 dakikalık ön denaturasyonu takiben, her siklus denatürasyon (95°C’de 50 saniye), bağlanma (50°C’de 50 saniye) ve uzama (65°C’de 1 dakika) aşamalarından oluşan 30 siklus ve 65°C’de 10 dakikalık son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri +4°C’de tutulmuştur. Daha sonra her PZR ürününden 10 µl olmak koşuluyla mililitresinde 10 µl ethidiyum bromid bulunan %1,5’lik agaroz jelde 100 voltluk akımda bir saat elektroforeze tabi tutulmuş ve son olarak ultraviole ışık altında görüntülenmiştir. İkinci aşamada, özgülükleri ve çoğalttıkları DNA bölgelerinin uzunluklarına göre seçilen primer çiftlerinin (cytob1/ORFX/MAR1bB2/ bovar1 ve bovar2A) en uygun bağlanma ısılarının belirlenmesi amacıyla derece derece değişen (gradient) PZR’u uygulanmıştır. Dereceli PZR’u her siklusun bağlanma ısısında 55°C’de 10°C’lik derecelendirme yapılmak kaydıyla yukarıda belirtilen şekilde yapılmış ve değerlendirilmiştir. Son aşamada, seçilen primer çiftleri (cytob1/MAR1bB2/bovar2A) ile her primer 0.4 µM konsantrasyonda olacak şekilde yukarıda belirtilen reaksiyon koşulları kullanarak multipleks PZR yapılmıştır. Daha sonra ilgili primer çiftleri ile çoğaltılan her türe özgü bantların agaroz jeldeki yoğunlukları karşılaştırılmış ve zayıf sonuç veren bantı çoğaltan primer çiftinin reaksiyondaki konsantrasyonu arttırılıp, güçlü sonuç vereninki azaltılarak deneme yanılma yoluyla her türe özgü geni çoğaltacak ilgili primer çiftinin son konsantrasyonu 0.2–0.5µM arasında olacak şekilde optimize edilmiştir. Primer konsantrasyonlarının belirlenmesinden sonra multipleks PZR’da kullanılan bileşenler (MgCl<sub>2</sub>, dNTP, PZR tampon solüsyonu; Tris-HCl (pH 8.3), KCl, gelatin) ve PZR koşullarının (bağlanma ısısı, uzama süresi gibi) optimizasyonu yapılmıştır. *Taq* DNA polimeraz magnezyuma bağımlı olarak çalışan bir enzimdir ve kullanılan MgCl<sub>2</sub> miktarının optimizasyonu reaksiyonun etkili olarak çalışmasında kritik öneme sahiptir. *Taq* DNA polimeraz enzimine ek olarak çoğaltmada

kullanılan hedef DNA, primer çiftleri ve dNTP'lerde reaksiyon esnasında ortamda bulunan magnezyuma bağlanmaktadır. Multipleks PZR'da kullanılacak optimal  $MgCl_2$  konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, reaksiyonda kullanılan dNTP konsantrasyonu 1 mM'da sabit tutularak  $MgCl_2$  konsantrasyonu dereceli olarak 2–8 mM arasında yükseltilmiştir. Sonuç olarak, 2mM  $MgCl_2$  konsantrasyonunda çoğaltılan kimi ürünlerde görülen özgül olmayan bantlar kaybolmuş ve reaksiyonun özgülüğü artmıştır. Daha sonra  $MgCl_2$  2mM'da sabit tutularak kullanılan dNTP konsantrasyonu aşamalı olarak 200–300mM arasında arttırılarak reaksiyonda kullanılacak optimal dNTP konsantrasyonu 300mM olarak belirlenmiştir. Multipleks PZR'da kullanılan tampon solüsyonun konsantrasyonunun 2x oranına kadar arttırılması karışıma adjuvantların eklenmesine oranla reaksiyonun etkinliğini daha fazla arttırdığı gösterilmiştir (Henegariu ve ark 1997, Markoulatus ve ark 2002). Bu amaçla reaksiyonda kullanılan PZR tampon solüsyonu 1,3x oranına (13 mM Tris-HCl (pH 8.3), 65 mM KCl, %0.0013 gelatin) yükseltilmiştir. Ayrıca reaksiyonda uygulanan bağlanma ısısı ve uzama süresi emperik olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, optimize edilen multipleks PZR 50 µl son hacimde; 13mM Tris-HCl (pH 8.3), 65mM KCl, 2 mM  $MgCl_2$ , %0.0013 gelatin ve her deoksinükleotid trifosfattan (dNTP) 300µM, 1 ünite Ampli *Taq* DNA polymerase (Applied Biosystems, Tokyo, Japonya), 0.5 µM cyto1 primer çifti, 0.2µM MAR1bB2 primer çifti ve 0.4µM bovar2A primer çifti karışımı ile 2 µl DNA örneği olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon Techne TC–512 marka otomatik termal sikluslu makinede gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 94°C'de 5 dakikalık ön denaturasyonu takiben, her siklus denaturasyon (95°C'de 50 saniye), bağlanma (56°C'de 50 saniye) ve uzama (65°C'de 50 saniye) aşamalarından oluşmak üzere 30 siklus ve 65°C'de 5 dakikalık son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri +4°C'de tutulmuştur. Daha sonra her PZR ürününden 10 µl olmak koşuluyla mililitresinde 10 µl ethidiyum bromid bulunan % 2'lik agaroz jelde 100 voltluk akımda bir saat elektroforeze tabi tutulmuş ve son olarak ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

#### 3.3.1.4. Tekli ve Multipleks PZR'larının Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi

Hayvanlarda görülen tek türe bağlı enfeksiyonlarda tekli ve multipleks PZR'unun duyarlılığının belirlenmesi amacıyla *B. bovis* aşısı suşu T, *A. marginale* St. Maries ve *T. annulata* Ankara/D7 izolatlarına ait eşit molariteye sahip DNA' lar ayrı ayrı 10 katlı olarak distile su ile sulandırılmıştır. Buna ek olarak, eş zamanlı olarak görülen enfeksiyonlarda testin duyarlılığının belirlenmesi amacıyla içerisinde eşit miktarlarda *B. bovis* aşısı suşu T, *A. marginale* St. Maries ve *T. annulata* Ankara/D7 DNA'ları bulunan karışım distile su kullanarak hazırlanan 10 katlı sulandırılmıştır. Anlatılan sulandırmaların hazırlanmasında daha önceden hazırlanan DNA örnekleri kullanıldığı için her sulandırmaya düşen yaklaşık parazit miktarı belirlenememiştir. Hazırlanan sulandırmalar ile tekli ve multipleks PZR'ları yukarıda belirten optimum şartlar kullanılarak yapılmıştır.

#### 3.3.1.5. Multipleks PZR yöntemi ile Elde Edilen Ürünlerin Sekans Analizleri İçin Klonlanması

Multipleks PZR ile çoğaltılan DNA örnekleri içerisinde 10 µg/ml ethidium bromid bulunan %2 agaroz jel elektroforezini takiben UV ışık altında görüntülenmiştir. *T. annulata*, *A. marginale* ve *B. bovis*' e özgü olan 312 bp, 265 bp ve 166 bp'lık çoğaltılan bölgelerine ait bantlar ayrı ayrı jelden kesilerek QIAquick jel ekstraksiyon kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılarak purifiye edilmiştir. Daha sonra purifiye edilen ürünler pCR4-TOPO plasmid vektörüne (Invitrogen™) klonlanarak TOP10 *E. coli* hücrelerine yukarıda anlatıldığı (3.2.1. Gereç ve Yöntem) şekilde transforme edilmiştir. Seçilen koloniler bir gece boyunca üretilmiş ve hücrelerde bulunan plazmidler QIAGEN plasmid purification kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılarak purifiye edildikten sonra *EcoRI* enzimi ile kesildikten sonra %1,5 agaroz gelde elektroforeze tabi tutulmuş ve UV ışık altında içinde klonlanan DNA'yı içeren plazmidler belirlenmiştir. Daha sonra bu plazmidlere ait 1-2 µg DNA örnekleri sekans analizlerinin yapılması amacıyla ticari sekans servisine gönderilmiştir (MWG Biotech, Almanya).

### 3.3.2. Bulgular

#### 3.3.2.1. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Tasarlanması ve Bunlara ait Nükleotid Dizilimleri

*Theileria annulata*, *A. marginale* ve *B. bovis* türlerini eş zamanlı olarak multipleks PZR ile teşhisinde kullanılacak primer çiftlerinin belirlenmesi için tasarlanan primer çiftleri ve bunlara ait nükleotid dizilimleri Çizelge 3.B.1’de verilmiştir. Tasarlanan primer çiftleri ve bunların özgül olduğu türlere ait gen bölgeleri aşağıda anlatılmıştır.

*Theileria annulata*’nın sitokrom b genini çoğaltmada kullanılan cyto1 primer çifti bu türe ait gen bölgesinin diğer *Theileria* ve *Babesia* türleri (*T. parva*, *B. bovis* ve *B. bigemina*) ile farklılık gösterdiği bölgelere özgü olacak şekilde tasarlanmıştır (3.2.1. Gereç ve Yöntem). Cyto1’ nin ileri ve geri yönlü primerlerinin *T. annulata* sitokrom b geni üzerindeki bağlanma bölgeleri bu tür içinde oldukça korunmuş kısımlardır ve tasarlanan primer çifti gene ait 312 bp’lık bölgeyi özgül olarak çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 3.B.1, A).

*Babesia bovis* genomu VESA1 proteinlerini kodlayan, SmORFs, değişken meroziot yüzey antijenlerini kodlayan, 40S ribozomal genleri ve ABC taşıyıcı ailesindeki proteinleri kodlayan gen bölgeleri gibi çok sayıda çoklu kopyaya sahip gen ailesini bünyesinde barındırmaktadır (Kelly ve ark 2007). Bu gen bölgelerinin bütünü yada bir kısmına ait nükleotid dizilimleri mevcut genom veri bankalarında yer almaktadır. Yapılan biyoinformatik çalışmada *B. bovis* genomunda kopya sayıları 3–1038 arasında değişen 48 gen ailesi belirlenmiştir. Clustal X (1.83) bilgisayar programı kullanılarak yapılan ön çalışmada 40S ribozomal genleri, ABC taşıyıcı ailesindeki proteinleri kodlayan gen bölgeleri ve *ves1* genleri haricinde geriye kalan gen ailelerindeki gen bölgelerinin çoğunda yüksek oranda farklılıklar görülmüştür ve bu sebeple *B. bovis*’in teşhisinde kullanılacak primer çiftleri clustal X bilgisayar programı ile yukarıda belirtilen belirtilen gen ailelerine ait gen bölgeleri kullanılarak tasarlanmıştır. Bu amaçla, 40S ribozomal proteinlerini kodlayan 4 gen bölgesi birbirleri arasında karşılaştırılmış ve bo40S primer çifti (F; 5’-GTG CGT GGC ATT TCA TTG AAG C-3’/R; 5’-TCA GAA ACG CTG GTG AAC G-3’) karşılaştırılan dört gen bölgesinde de ortak olan iyi korunmuş 204 bp’lık kısmı çoğaltmak için tasarlanmıştır (Şekil 3.B.2, A). ABC taşıyıcı proteinleri kodlayan beş gen bölgesi birbirleri ile karşılaştırılmış ve bunların arasındaki üç gen arasında ortak korunmuş olan 124 bp’lık kısmın çoğaltılması için boABC primer çifti (F; 5’-CAC GTG TCA TTT CTG AGC-3’/R; 5’-CAA CGG TTC TCC AGT TGT-3’) tasarlanmıştır (Şekil 3.B.2, B). *Ves1* genleri VESA1 $\alpha$  ile VESA1 $\beta$  alt ünitelerini ihtive eden (Al-Khedery ve Allred 2006) *B. bovis* genomundaki en geniş gen

ailesini oluşturur (Kelly ve ark 2007). Yapılan genom analizlerinde *ves1* genlerini oluşturduğu kabul edilen 119 gen bölgesi belirlenmiştir. Bunların 72 tanesinin VESA1 $\alpha$  proteinlerini, 43 tanesinin VESA1 $\beta$  proteinlerini kodlayan gen bölgeleri, kalan dört tanesinde sınıflandırılmamış gen bölgeleri olduğu belirlenmiştir (Kelly ve ark 2007). Bu çalışmada VESA1 $\beta$  alt ünitesinde bulunan 41 gen birbirleri ile karşılaştırılmış ve bunların 25 tanesinde ortak korunmuş bölge belirlenmiştir. Bovar1 primer çifti (F; 5'-AGG CCC CCT CCA TGG GAT GTA-3'/R; 5'-CCT CAG GAA ATA GAG CTG G-3') 25 gende belirlenen 127 bp'lık bu ortak korunmuş bölgenin çoğaltılmasında kullanılmak üzere tasarlanmıştır (Şekil 3.B.2, E). *B. bovis* genomunda bulunan VESA1 $\alpha$  alt ünitesini kodlayan gen bölgelerini PZR ile çoğaltacak primer çiftlerinin tasarlanması amacıyla bu ailedeki 72 gen bölgesi birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda karşılaştırılan 72 *ves1 $\alpha$*  geninin 47 tanesinde herhangi bir uzunluk farklılığı göstermeyen 166 bp'lık bölge bir bölge belirlenmiştir. 47 genin 23 tanesinde primer bağlanma bölgelerinde görülen tek nükleotid farklılıkları haricinde (SNP) belirlenen bu bölgenin 5' ve 3' kısımları oldukça iyi korunmuş olduğu görülmüştür. Tek nükleotid farklılığı gösteren 23 gen çıkartıldığında geriye kalan 24 gen bölgesine ait 166 bp'lık ortak korunmuş bölgenin çoğaltılması amacıyla bovar2A primer çifti (F; 5'-CAA GCA TAC AAC CAG GTG G-3'/R; 5'-ACC CCA GGC ACA TCC AGC TA-3') tasarlanmıştır (Şekil 3.B.1, C). 24 gen arasında bovar2A primer çiftinin çoğaltacağı bölgede görülen nükleotid polimorfizminin belirlenmesi amacıyla DnaSP 4.9 programı (<http://www.ub.es/dnasp/>) kullanılarak yapılan analizde primerlerin bağlanma bölgeleri arasında kalan çoğaltılacak bölgede yüksek oranda nükleotid polimorfizmi belirlenmiştir (Şekil 3.B.3). Buna ilaveten, tasarlanan bovar2A primer çifti ile aynı ileri yönlü primere sahip ancak geri yönlü primer bağlanma bölgesi bovar2A geri yönlü primerinin bağlanma bölgesinden 22 bp ilerde olan ve 188 bp'lık bir bölgeyi çoğaltan bovar2B primer çifti (F; 5'-CAA GCA TAC AAC CAG GTG G-3'/R; 5'-CTA TCA TG(CT) TCC ATG GGG-3') daha tasarlanmıştır. Son olarak *B. bovis* genomunda belirlenen VESA1 $\alpha$ 'yı kodlayan 5 gen bölgesi birbirleri ile karşılaştırılarak hepsinde ortak korunmuş olan 243 ve 103 bp'lık iki bölge belirlenmiştir. Bu bölgelere özgü bovar3A (F; 5'-GGA CCT ACT GTA TGA CGC C-3'/R; 5'-TGC CAC CCA ACC CAC TTC T-3') ve bovar3B (F; 5'-ATG GGA TGT ACG CCA ATG GG-3'/R; 5'-AGC TGG TAG AAG CAG TGG-3') primer çiftleri sırasıyla 243 ve 103 bp'lık bölgeleri çoğaltmak amacıyla tasarlanmıştır. Tasarlanan bovar3A primer çiftinin çoğalttığı 243 bp'lık bölge gen ailesinde bulunan üç gende 6–9 nükleotid farklılığı göstermiştir (Şekil 3.B.2, C ve D).



(A)

bovar40S forward

40S GTGCGTGGCATTTCATTGAAGCTTCAGGAGGAAGAGCGTGAGCGCCGCATGGACTTTGTTCCCGAACGTTCCGAGGTTGATGTGCCTCTCATCCAGGTTGACCAGGACACCGCTGACATGTTGACGTTCCCTCAAG  
 40S GTGCGTGGCATTTCATTGAAGCTTCAGGAGGAAGAGCGTGAGCGCCGCATGGACTTTGTTCCCGAACGTTCCGAGGTTGATGTGCCTCTCATCCAGGTTGACCAGGACACCGCTGACATGTTGACGTTCCCTCAAG  
 40S GTACGTGGCATTTCATTGAAGCTGCAGGAGGAAGAGCGTGAGCGCCGCATGGACTTTGTTCCCGAACGTTCCGAGGTTGATGTGCCTCTCATCCAGGTCGACCAGGACACCGCTGACATGTTGACGTTCCCTCAAG  
 40S GTGCGTGGCATTTCATTGAAGCTTCAGGAGGAAGAGCGTGAGCGCCGCATGGACTTTGTTCCCGAACGTTCCGAGGTTGATGTGCCTCTCATCCAGGTTGACCAGGACACCGCTGACATGTTGACGTTCCCTCAAG  
 \* \* \* \* \*

bovar40S reverse

40S TTGAACATACCTAACGTTAAAGGTTATCACTGCCAACGTGCATACTGAGGGCGTTTACCAGCGTTTCTGA  
 40S TTGAACATACCTAACGTTAAAGGTTATCACTGCCAACGTGCATACTGAGGGCGTTTACCAGCGTTTCTGA  
 40S TTGAACATACCTAACGTTAAAGGTTATCACTGCCAACATGCACAGTGAGGGCGTTTACCAGCGTTTCTGA  
 40S TTGAACATACCTAACGTTAAAGGTTATCACTGCCAACGTGCATACTGAGGGCGTTTACCAGCGTTTCTGA  
 \* \* \* \* \*

(B)

bovarABC forward

bovarABC reverse

ABC CACGTGTCATTTCTGAGCAAGGTTACTCACTGAGTGGTGGGCAACGTGTTAGAGTGGGCTGGCTAGGGCCCTTTATGCCTATATGATATTGAGCAAAGCTAATGAACAACCTGGAGAACCGTTG  
 ABC CACGTGTAATTTCTGAGCAAGGTTACTCACTGAGTGGTGGGCAACGTGTTAGAGTGGGCTGGCTAGGGCCCTTTATGCCTATATGATATTGAGCAAAGCTAATGAACAACCTGGAGAACCGTTG  
 ABC CACGTGTCATTTCTGAGCAAGGTTACTCACTGAGTGGTGGGCAACGTGTTAGAGTGGGCTGGCTAGGGCCCTTTATGCCTATATGATATTGAGCAAAGCTAATGAACAACCTGGAGAACCGTTG  
 \* \* \* \* \*

(C)

bovar3A forward

vesa-1a GGACCTACTGTATGACGCCAAGGACCCGGGGTCCCCTGGTCCCAGCTCTGAGAGGTAAGACTGGGATGGCATACTCCTAGAGCAGGAGAGTGACATTTGTCAATCCAGTGCTCACGGACCTGGG  
 vesa-1a GGACCTACTGTATGACGCCAAGGACCCGGGGTCCCCTGGTCCCAGCCCTAAGAGGAAGTGGGATGACATGCTCCTAACAGAGGAAAGTACTATTGTCAAGCCAGTGCTGGGAGACCTGGG  
 vesa-1a GGACCTACTGTATGACGCCAAGGACCCGGGGTCCCCTGGTCCCAGCCAACAGAGGTAAGTGGGATGGCATACTCTAGACCAGGAGAAGACATTAAGTGTCAAGCCAGTGCTCACGGACCTGGG  
 vesa-1a GGACCTACTGTAAGGACGCCAGGTTCCCAGGGTCCCCTGGTCCCAGCCCTGAGAGGTAAGTGGGATGGCATACTCTAGACCAGGAAAGTCCATAGTCAAGCCAGTGCTCACGGACCTGGG  
 vesa-1a GGACCTACTGTATGACGCCAGGTTCCCAGGGTCCCCTGGTCCCAGCCCTAAAAGTACTGGGAGGACCTGCTCCTAGGACAGGAGAAGGACATTGTCAAGCCAGTGCTCACGACCTGG  
 \* \* \* \* \*

bovar3A reverse

vesa-1a ACTCCTTAATGGTGGCAGCACTGATAGCACTACTGCTAGTACTACCTGCGCCGGTGGTACCAGGTCATAAGGGCACTGATAGACCAGTTGGCACAGGGACTACAGAAGTGGGTTGGGTGGCA  
 vesa-1a ACTCCTTAGTGTGATGGGAG-----TAGCACTAGTGTGCTGCCAGTACTTGTGCTGGAGGTACCAGGTCATAAAGGCACTGATAGACCAGTTGGCACAGGGACTGCAGAAGTGGGTTGGGTGGCA  
 vesa-1a ACTCCT---TGGTGACAG-----CACTAGTGTGCTAGGGATACCTGCGCCGGTGGCACCGAGGTCAATAAGCACTGATAGACCAGTTGGCACTGGGACTACAGAAGTGGGTTGGGTGGCA  
 vesa-1a ACTCCTAAGTGGTGGCAG-----CACTAGTGTGCCAGGGATACCTGCGCTGGTGGCACCGAGGTCAATAGGGCACTGATAGACCAGTTGGCACTGGGACTACAGAAGTGGGTTGGGTGGCA  
 vesa-1a ACTTCTTAGTGGTGGAACTAGTGCAGCTACTAGTACTACCTATACTTGTGCTGGTGGCACCGAAGTCATTAGGGCACTGATAGACCAGTTGGCACTGGGACTACAGAAGTGGGTTGGGTGGCA  
 \* \* \* \* \*

(D)

bovar3B forward

bovar3B reverse

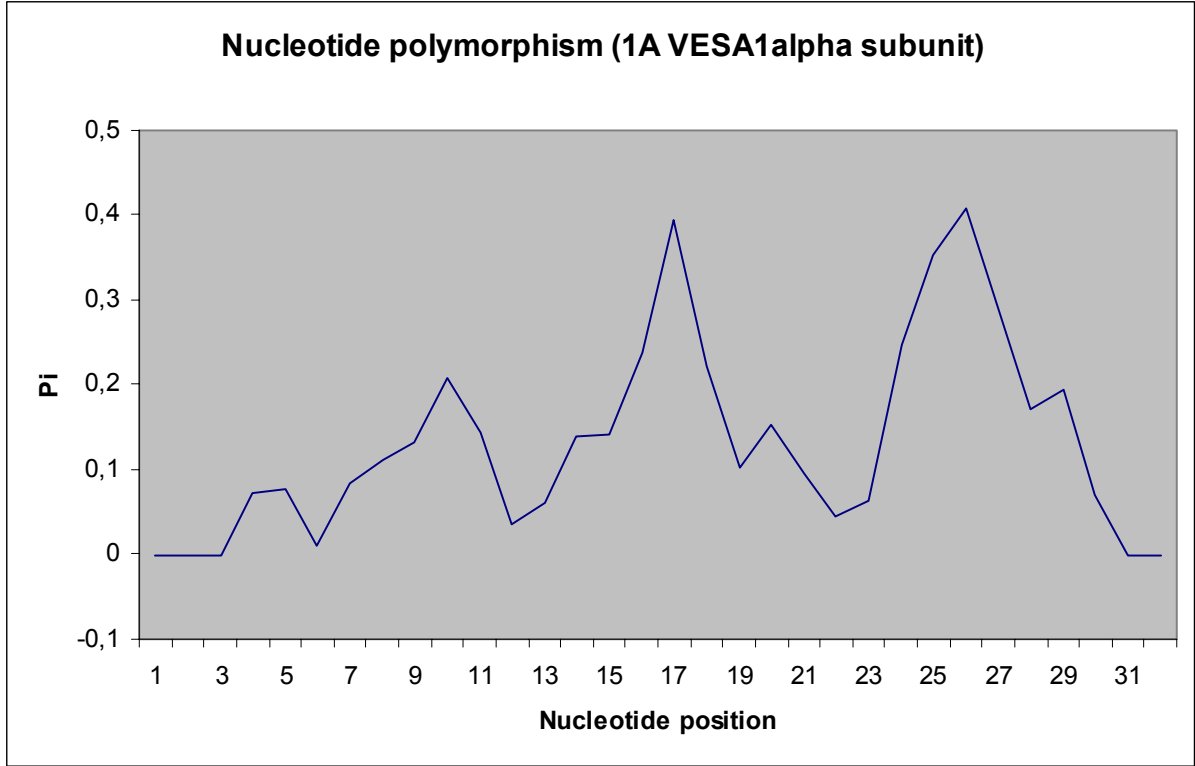
vesa-1a ATGGGATGTACGCCAATGGGCTCTTTGGCTTTCCAGATGGACCTTTTCGGCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCT  
 vesa-1a ATGGGATGTACGCCAATGGGCTCTTTGGCTTTGACATGGAGGCTCTCCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGATATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCT  
 vesa-1a ATGGGATGTATGCCAATGGGCTCTTTGGCTTTGACATGGAGGCTCTCCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCT  
 vesa-1a ATGGGATGTATGCCAATGGGCTCTTTGGCTTTGACATGGAGGCTCTCCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGCATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCT  
 vesa-1a ATGGGATGTATGCCAATGGGCTCTTTGGCTTTGACATGGAGGCTCTCCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGATATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCT  
 \* \* \* \* \*

(E)

```
bovar1 forward                                     bovar1 reverse
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTACGCCAATGGGCTCTTTGGCTTCCAGATGGACGGCTCTCCCGCCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTGAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTACGCCAATGGGCTCTTTGGCTTCCAGATGGAGATTAGTCCCGCCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGATATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTGAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTATGCCAATGGGCTATATGGGTTTGACATGGACCTTTCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCACTCTATTTCCCTAAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTATGCCAATGGGCTCTTTGGCTTTGACATGGACGGCTCTCCTGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTAAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTACGCCAATGGGTTATATGGCTTCCAGATGGACGGCTCTCCCGCCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTGAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTACGCCAATGGGCTCTTTGGGTTTGACCTGGGAGGCTCTGCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGATATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTGAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTATGCCAATGGGCTATATGGGTTTGAGATGGGCGGCTCTCCACCCAGTGCCTGGAACAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTAAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTATGCCAATGGGTTTTATGGCTTTGACATGGGCGGCTCTGCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGATATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTTAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCAGGGATGTACGCCAATGGGCTCTTTGGCTTCCAGATGGACCTTTCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTAAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTACGCCAATGGGCTCTTTGGCTTTGACATGGACCTTTCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTGAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTATGCCAATGGGCTCTTTGGCTTTGACATGGGCGGCTCTGCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTAAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTATGCCAATGGGCTCTTTGGCTTCCAGATGGACGGCTCTCCCGCCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTGAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTACGCCAATGGGCTCTTTGGCTTTGACATGGGCGGCTCTGCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTAAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCAGGGATGTATGCCAATGGGCTCTTTGGCTTCCAGATGGACATTAGTACCGCCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGATATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTGAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTATGCCAATGGGCTCTTTGGCTTCCAGATGGACATTAGTCCCGCCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCCACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTGAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTACGCCAATGGGCTCTTTGGCTTCCATATGGACCTTTCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGATATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTGAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTATGCCAATGGGCTCTTTGGCTTCCAGATGGACCTTTCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTGAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCAGGGATGTATGCCAATGGGCTCTTTGGCTTCCAGATGGACATGTCTTCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTAAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCAGGGATGTATGCCAATGGGCTCTTTGGCTTCCAGATGGACCTTTCCGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTAAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTATGCCAATGGGCTCTTTGGCTTTGACATGGGAGGCTCTCCTGCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGATATATGTCTACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTGAGG
vesa-1beta AGGCCCCCTCCATGGGATGTACGCCAATGGGCTCTTTGGCTTCCAGATGGACGGCTCTCCCGCCCAGTGCCTGGACCAACTGAGGGTATATGTATAACCACTGCTTCTACCAGCTCTATTTCCCTGAGG
** ***** ** ** ***** ***** * * ** * ** * ** * ** * ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
```

Şekil 3.B.2. *Babesia bovis*'in teşhisinde çoklu kopyaya sahip gen ailelerinin çoğaltılması amacıyla tasarlanan primer çiftleri ve bunların çoğaltacakları ailedeki genler arasında korunmuş olan bölgeler ve nükleotid dizimleri. (A); 40S ribozomal proteinleri kodlayan gen ailesini çoğaltmada kullanılan bovar40S primer çiftinin gen üzerindeki bağlanma yerleri ve çoğaltılacak bölgeye ait nükleotid dizilimi, (B); ABC taşıyıcı proteinlerini odlayan gen ailesini çoğaltmada tasarlanan bovarABC primer çiftinin gen üzerindeki bağlanma yerleri ve çoğaltılacak bölgeye ait nükleotid dizilimi, (C) ve (D); Vesa-1a gen ailesinde belirlenen bölgeleri çoğaltmada kullanılan bovar3A (C) ve bovar3B (D) primer çiftlerinin gen üzerindeki bağlanma yerleri ve çoğaltacakları bölgelere ait nükleotid dizilimi, (E); Vesa-1 $\beta$  gen ailesinde bulunan 25 gende ortak korunmuş bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan bovar1 primer çiftinin 25 gen üzerindeki bağlanma yerleri ve çoğaltılacak bölgeye ait nükleotid dizilimi. Karşılaştırılan nükleotid dizimleri arasındaki korunmuş baz bölgeleri '\*' işareti ile, boşluklar ise '-' işareti ile gösterilmektedir. **Gölgelenmiş bölgeler** (A, B, C, D ve E) her primer çiftinin o gen bölgesinde bağlanacağı kısımları göstermektedir.





**Şekil 3.B.3.** *Babesia bovis*'in çoğaltılmasında kullanılan bovar2A primer çiftinin tasarlandığı 24 vesal $\alpha$  alt ünite gen ailesinde görülen nükleotid polimorfizmi.

*Theileria annulata* (8.35 Mb) (Pain ve ark 2005) ve *B. bovis* (8.2 Mb) (Kelly ve ark 2007) genomu ile karşılaştırıldığında *A. marginale* (1.2 Mb) genomu daha küçük boyutlarda ve daha az sayıda çoklu kopya ailesine sahip gen bölgeleri içermektedir (Kelly ve ark 2004). *A. marginale* genomunda bulunan major yüzey protein1 (MSP1) *mSP1a* geni tarafından kodlanan MSP1a ve *mSP1b* genleri tarafından kodlanan MSP 1b adlı iki polipeptidten oluşan dimer yapısında bir moleküldür. Bu proteinlerden MSP1a'yı kodlayan *mSP1a* geni tek kopyalı bir gen olup *A. marginale*'nin farklı izolatları arasında uzunluk bakımından farklılık göstermektedir. MSP1b proteini ise ikisi tüm gen bölgesi, üçüde kısmi gen bölgelerinden oluşmak üzere beş genden oluşan küçük bir çoklu kopyalı gen ailesi tarafından kodlanmaktadır (Kelly ve ark 2004). *MSP1b* gen ailesinde bulunan gen bölgelerine özgü primerlerin tasarlanması amacıyla bu ailedeki genlerin birbirleri arasında clustal X bilgisayar programı ile yapılan karşılaştırmasında gen ailesinde bulunan üç gen arasında 92 bp'lık korunmuş bölge belirlenmiş ve MAR1bA primer çifti (F; 5'-GAG TAC CTT CAC AGT AAC G-3'/R; 5'-GCA CAC GTC ATG ATG CCA CC-3') belirlenen bu bölgenin PZR ile çoğaltılması amacıyla tasarlanmıştır (Şekil 3.B.4, A). Ayrıca *MSP1b* gen ailesinde bulunan iki gen bölgesinin karşılaştırılması sonucunda bu iki genin birbirleri arasında %100 oranında

benzerlik gösterdiği belirlenmiş ve bu genlere ait 382 ve 265 bp'lık ortak korunmuş bölgelerin çoğaltılması amacıyla sırasıyla MAR1bB1 (F; 5'-CAG CTC AAG CTA CCT GGG-3'/ R; 5'-CCC TTG AGC GAT GTC TGT G-3') ve MAR1bB2 (F; 5'-GCT CTA GCA GGT TAT GCG TC-3'/ R; 5'-CTG CTT GGG AGA ATG CAC CT-3') primer çiftleri tasarlanmıştır (Şekil 3.B.4, A ve B). Yapılan biyoinformatik çalışmada *A. marginale* genomunda kopya sayıları 6–12 arasında değişen ORFX ve ORFY gen aileleri belirlenmiştir. 12 kopyalı ORFX gen ailesinde bulunan gen bölgelerinin clustal X bilgisayar programı ile karşılaştırılması sonucunda bu ailede bulunan sekiz gen bölgesi arasında belirlenen 181 bp'lık korunmuş bölgenin çoğaltılması amacıyla MARorfX primer çifti (F; 5'-CAG CGA CTG TTG TTA TAT G-3'/R; 5'-TTA GCC ATA AGC TTA CCA GC-3') tasarlanmıştır (Şekil 3.B.4, C). Son olarak, *A. marginale* genomunda bulunan altı kopyalı ORFY gen ailesi arasındaki 265 bp'lık korunmuş bölgenin çoğaltılması amacıyla MARorfY (F; 5'-ATG GTA GCC CTG ATA TGG-3'/R; 5'-CCT ATG GCT GTA CA(TC) ACA ACC-3') primer çifti tasarlanmıştır (Şekil 3.B.4, D).

Tasarlanan primer çiftleri nükleotid blast programı kullanılarak NCBI veri tabanında kayıtlı genler ile karşılaştırıldığında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) primer çiftlerinin tasarlandığı türlere özgü olduğu belirlenmiş ve çoğaltılacak DNA üzerindeki hedef bölgeleri haricindeki alanlara kısmi benzerlik göstermemiştir.

(A) MAR1bA forward MAR1bA reverse  
Msp1 $\beta$ \_1 GAGTACCTTCACAGTAACGTAGAACAAAGCAACTAAAGACCTCATGGCTTCAGAGTTTGCCATGATGACATTTGGTGGCATCATGACGTGTGC  
Msp1 $\beta$ \_2 GAGTACCTTCACAGTAACGTAGAACAAAGCAACTAAAGACCTCATGGCTTCAGAGTTTGCCATGATGACATTTGGTGGCATCATGACGTGTGC  
Msp1 $\beta$ \_3 GAGTACCTTCACAGTAACGTAGAACAAAGCAACTAAAGACCTCATGGCTTCAGAGTTTGCCATGATGACATTTGGTGGCATCATGACGTGTGC  
\*\* \* \* \* \* \*

(B) MAR1bB1 forward  
Msp1 $\beta$ \_1 CAGCTCAAGCTACCTGGGAAGGCTTGGCTATGACCGGTAAGTTCATGGGTGCTGTAGCTAACTAGCTGGTGCAGTATCCATGTGCGTTGCAGCATAACCCGAGCTATCGTGGGTATGGCCGAGCTACACCT  
Msp1 $\beta$ \_1 CAGCTCAAGCTACCTGGGAAGGCTTGGCTATGACCGGTAAGTTCATGGGTGCTGTAGCTAACTAGCTGGTGCAGTATCCATGTGCGTTGCAGCATAACCCGAGCTATCGTGGGTATGGCCGAGCTACACCT  
\* \* \* \* \*  
Msp1 $\beta$ \_1 GCGACGCTGCTGCTGACAGCTATGGACAATCAATCCGTAACAATGCCGTAGTTAAAGTCAGTGAGTACCTTCACAGTAACGTAGAACAAAGCAACTAAAGACCTCATGGCTTCAGAGTTTGCCATGATGACA  
Msp1 $\beta$ \_1 GCGACGCTGCTGCTGACAGCTATGGACAATCAATCCGTAACAATGCCGTAGTTAAAGTCAGTGAGTACCTTCACAGTAACGTAGAACAAAGCAACTAAAGACCTCATGGCTTCAGAGTTTGCCATGATGACA  
\* \* \* \* \*  
MAR1bB1 reverse  
Msp1 $\beta$ \_1 TTTGGTGGCATCATGACGTGTGCCAAGCTTATGAAGGGCTCCTTCGAGCAATCAATCAGAAGTTTGAAGAAATCAACGCCACCTCACACGGGAGGCCACAGACATCGCTCAAGGG  
Msp1 $\beta$ \_1 TTTGGTGGCATCATGACGTGTGCCAAGCTTATGAAGGGCTCCTTCGAGCAATCAATCAGAAGTTTGAAGAAATCAACGCCACCTCACACGGGAGGCCACAGACATCGCTCAAGGG  
\* \* \* \* \*

(C) MARorFX forward  
ORFX CAGCGACTGTTGTTATATGTAATGTTATACGGTTTGTGCAGAAGCTGGGACTACCCATCATGACTGGAGTGATACTAGGTTCTAGCATTATGGCTATCTTTGGTAAGCTTGCATGGCCTGCTATTGT  
ORFX CAGCGACTGTTGTTATATGTAATGTTATACGGTTTGTGCAGAAGCTGGGACTACCCATCATGACTGGAGTGATACTAGGTTCTAGCATTATGGCTATCTTTGGTAAGCTTGCATGGCCTGCTATTGT  
ORFX CAGCGACTGTTGTTATATGTAACGTTTATACGGTTTGTGCAGAAGCTTGGGCTTCCTATCATGACTGGAGTGATACTAGGTTCTAGCATTATGGCTATCTTTGGTAAGCTTGCATGGCCTGCTATTGT  
ORFX CAGCGACTGTTGTTATATGTAACGTTTATACGGTTTGTGCAGAAGCTTGGGCTTCCTATCATGACTGGAGTGATACTAGGTTCTAGCATTATGGCTATCTTTGGTAAGCTTGCATGGCCTGCTATTGT  
ORFX CAGCGACTGTTGTTATATGTAACGTTTATACGGTTTGTGCAGAAGCTTGGGCTTCCTATCATGACTGGAGTGATACTAGGTTCTAGCATTATGGCTATCTTTGGTAAGCTTGCATGGCCTGCTATTGT  
ORFX CAGCGACTGTTGTTATATGTAACGTTTATACGGTTTGTGCAGAAGCTTGGGCTTCCTATCATGACTGGAGTGATACTAGGTTCTAGCATTATGGCTATCTTTGGTAAGCTTGCATGGCCTGCTATTGT  
ORFX CAGCGACTGTTGTTATATGTAACGTTTATACGGTTTGTGCAGAAGCTTGGGCTTCCTATCATGACTGGAGTGATACTAGGTTCTAGCATTATGGCTATCTTTGGTAAGCTTGCATGGCCTGCTATTGT  
ORFX CAGCGACTGTTGTTATATGTAACGTTTATACGGTTTGTGCAGAAGCTTGGGCTTCCTATCATGACTGGAGTGATACTAGGTTCTAGCATTATGGCTATCTTTGGTAAGCTTGCATGGCCTGCTATTGT  
ORFX CAGCGACTGTTGTTATATGTAACGTTTATACGGTTTGTGCAGAAGCTTGGGCTTCCTATCATGACTGGAGTGATACTAGGTTCTAGCATTATGGCTATCTTTGGTAAGCTTGCATGGCCTGCTATTGT  
ORFX CAGCGACTGTTGTTATATGTAACGTTTATACGGTTTGTGCAGAAGCTTGGGCTTCCTATCATGACTGGAGTGATACTAGGTTCTAGCATTATGGCTATCTTTGGTAAGCTTGCATGGCCTGCTATTGT  
\* \* \* \* \*  
MARorFX reverse  
ORFX AATGTTGGTTGTATTTACAGCTATATTCTTTGGTGCTGGTAAGCTTATGGCTAA  
ORFX AATGTTGGTTGTATTTACAGCTATATTCTTTGGTGCTGGTAAGCTTATGGCTAA  
ORFX AATGTTGGTTGTATTTACAGCTATATTCTTTGGTGCTGGTAAGCTTATGGCTAA  
ORFX AATGTTGGTTGTATTTACAGCTATATTCTTTGGTGCTGGTAAGCTTATGGCTAA  
ORFX AATGTTGGTTGTATTTACAGCTATATTCTTTGGTGCTGGTAAGCTTATGGCTAA  
ORFX AATGTTGGTTGTATTTACAGCTATATTCTTTGGTGCTGGTAAGCTTATGGCTAA  
ORFX AATGTTGGTTGTATTTACAGCTATATTCTTTGGTGCTGGTAAGCTTATGGCTAA  
ORFX AATGTTGGTTGTATTTACAGCTATATTCTTTGGTGCTGGTAAGCTTATGGCTAA  
ORFX AATGTTGGTTGTATTTACAGCTATATTCTTTGGTGCTGGTAAGCTTATGGCTAA  
ORFX AATGTTGGTTGTATTTACAGCTATATTCTTTGGTGCTGGTAAGCTTATGGCTAA  
ORFX AATGTTGGTTGTATTTACAGCTATATTCTTTGGTGCTGGTAAGCTTATGGCTAA  
\* \* \* \* \*

(D)

**MARorfY forward**

```
ORFY ATGGTAGCCCTGATATGGTTATTCATCACAGCAGGTTCTACTAATGCCGATACTATCAGCAGTACTAACACTGCTGACGATACAGCTACCAAGGTTATTTGTGACGTCATTGTCTTCGTGCAGAAGCTGGGATTA
ORFY ATGGTAGCCCTGATATGGTTATTCATCACAGCAGGTTCTACTAATGCCGATACTATCAGCAGTACTAACACTGCTGACGATACAGCTACCAAGGTTATTTGTGACGTCATTGTCTTCGTGCAGAAGCTGGGATTA
ORFY ATGGTAGCCCTGATATGGTTATTCATCACAGCAGGTTCTACTAATGCCGATACTATCAGCAGTACTAACACTGCTGACGATACAGCTACCAAGGTTATTTGTGACGTCATTGTCTTCGTGCAGAAGCTGGGATTA
ORFY ATGGTAGCCCTGATATGGTTATTCATCACAGCAGGTTCTACTAATGCCGATACTATCAGCAGTACTAACACTGCTGACGATACAGCTACCAAGGTTATTTGTGACGTCATTGTCTTCGTGCAGAAGCTGGGATTA
ORFY ATGGTAGCCCTGATATGGTTATTCATCACAGCAGGTTCTACTAATGCCGATACTATCAGCAGTACTAACACTGCTGACGATACAGCTACCAAGGTTATTTGTGACGTCATTGTCTTCGTGCAGAAGCTGGGATTA
*****
```

**MARorfY reverse**

```
ORFY CCCATCATGACAGGGGTGGTACTAGGTTCTGGCGTCATGGCTTGGCACACTTGCATGGCCTGCCATGGTAATGCTGGTTGTGTGTACAGCCATAGG
ORFY CCCATCATGACAGGGGTGGTACTAGGTTCTGGCGTCATGGCTTGGCACACTTGCATGGCCTGCCATGGTAATGCTGGTTGTATGTACAGCCATAGG
ORFY CCCATCATGACAGGGGTGGTACTAGGTTCTGGCGTCATGGCTTGGCACACTTGCATGGCCTGCCATGGTAATGCTGGTTGTATGTACAGCCATAGG
ORFY CCCATCATGACAGGGGTGGTACTAGGTTCTGGCGTCATGGCTTGGCACACTTGCATGGCCTGCCATGGTAATGCTGGTTGTGTGTACAGCCATAGG
ORFY CCCATCATGACAGGGGTGGTACTAGGTTCTGGCGTCATGGCTTGGCACACTTGCATGGCCTGCCATGGTAATGCTGGTTGTGTGTACAGCCATAGG
*****
```

**Şekil 3.B.4.** *Anaplasma marginale*'nin teşhisinde kullanılmak üzere çoklu kopyaya sahip gen ailelerinin çoğaltılması amacıyla tasarlanan primer çiftleri ve bunların çoğaltacakları ailedeki genler arasında korunmuş olan bölgeler ve nükleotid dizilimleri. (A) ve (B); Msp1 $\beta$  gen ailesini çoğaltmada kullanılan MAR1bA (A) ve MAR1bB1 (B) primer çiftlerinin genler üzerindeki bağlanma yerleri ve çoğaltılacak bölgeye ait nükleotid dizilimi, (C); ORFX gen ailesini çoğaltmada tasarlanan MARorfX primer çiftinin gen üzerindeki bağlanma yerleri ve çoğaltılacak bölgeye ait nükleotid dizilimi, (D); ORFY gen ailesini çoğaltmada tasarlanan MARorfY primer çiftinin gen üzerindeki bağlanma yerleri ve çoğaltılacak bölgeye ait nükleotid dizilimi. Karşılaştırılan nükleotid dizilimleri arasındaki korunmuş baz bölgeleri '\*' işareti ile, boşluklar ise '-' işareti ile gösterilmektedir. **Gölgelenmiş bölgeler** (A, B, C ve D) her primer çiftinin o gen bölgesinde bağlanacağı kısımları göstermektedir.

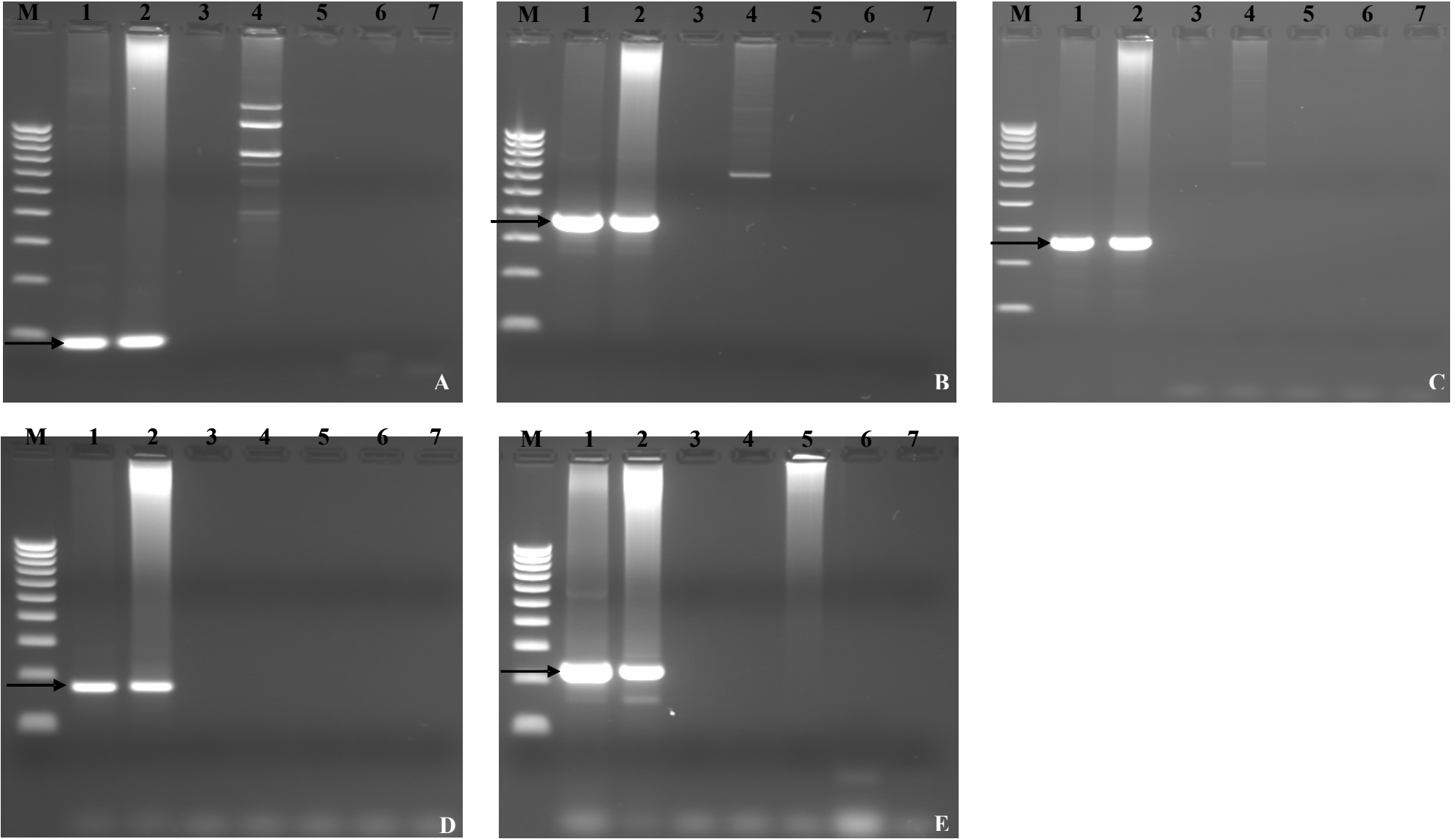
### 3.3.2.2. Tasarlanan Primer Çiftlerinin Tekli PZR ile Özgüllüklerinin Değerlendirilmesi

*Theileria annulata*'nın tespitinde kullanılacak olan cyto1 primer çiftine ait sonuçlar 3.2.2. Bulgular kısmında verilmiştir.

*Anaplasma marginale* türüne özgü tasarlanan primer çiftlerinin (Mar1bA, MAR1bB1, MAR1bB2, MARorfX ve MARorfY) özgüllükleri farklı bölgelere ait iki *A. marginale* (Aydın, St.Maries) izolatu, *A. centrale*, *A. phagocytophila*, *T. annulata* ve *B. bovis* DNA örnekleri kullanılarak 3.3.1. Gereç ve Yöntem kısmında anlatılan temel PZR ile belirlenmiştir. Yapılan PZR sonucunda tasarlanan Mar1bA, MAR1bB1, MAR1bB2, MARorfX ve MARorfY primer çiftleri ile *A. marginale* izolatlarına ait sırası ile 92, 382, 265, 181 ve 231 bp'lık bölgeler özgül olarak çoğaltılmıştır (Resim 3.B.1. A, B, C, D ve E). Mar1bA, MAR1bB1, MAR1bB2 primer çiftlerinde *T. annulata*'ya ait DNA örneğinde görülen 500 bp ve yukarı boyutlardaki özgül olmayan bantlar (Resim 3.B.1. A, B ve C) haricinde beklendiği şekilde kullanılan diğer türlere ait (*A. centrale*, *A. phagocytophila* ve *B. bovis*) DNA örnekleri ile herhangi bir ürün çoğaltılmamıştır (Resim 3.B.1). *T. annulata* DNA'sı kullanılan örneklerde görülen özgül olmayan bantlar muhtemelen Resim 3.B.1 (E), sıra 5'teki simir görüntüsünde olduğu gibi kullanılan DNA örneğinin çok yoğun olmasından kaynaklanmıştır.

*Babesia bovis* türünün tespitinde kullanılmak üzere tasarlanan bovar1, bovar40S, bovar2A, bovar2B, bovarABC, bovar3A ve bovar3B primer çiftlerinin özgüllükleri farklı bölgelere ait dokuz *B. bovis* (Meksiko, Kusanwyanga, M07, Lismore, Galed saha suşu, Gonen saha suşu, Aşı suşu T, Aşı suşu MH ve Aydın) izolatu, *T. annulata*, *A. marginale*, *A. centrale* ve *B. bigemina* DNA örnekleri kullanılarak 3.3.1. Gereç ve Yöntem kısmında anlatılan temel PZR ile belirlenmiştir. Bovar1 primer çifti kullanılarak yapılan PZR ile beklendiği şekilde tüm *B. bovis* izolatlarında 127 bp'lık bölge çoğaltılmıştır, ancak kullanılan çoğu izolatta ~100 bp'lık ikincil bir bant oluşumu görülmüştür. Bunun haricinde kullanılan diğer türlere ait DNA örnekleri ile herhangi bir çoğalma gözlenmemiştir (Resim 3.B.2, A). Bovar40S primer çifti ile tüm *B. bovis* izolatlarında 204 bp'lık bölge özgül olarak çoğaltılmıştır. *B. bigemina* ile elde edilen 1000 bp'ın üzerindeki özgül olmayan bant haricinde kullanılan diğer türlere ait DNA örneklerinde hiçbir çoğalma görülmemiştir (Resim 3.B.2, B). Bovar2A ve bovar2B primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda tüm *B. bovis* izolatlarında beklendiği şekilde 166 ve 188 bp'lık bölgeler çoğaltılmıştır. Bovar2B primer çifti ile kullanılan çoğu izolatta çoğaltması beklenen 188 bp'lık bölgeye ilaveten ~120 ve 200 bp uzunlukta özgül olmayan çoğalmalar haricinde ne bovar2A nede bovar2B primer çifti kullanılan diğer türlere ait DNA

örneklerinde çoğalma oluşturmamıştır (Resim 3.B.2, C ve D). BovarABC primer çifti ile yapılan PZR sonucunda 124 bp'lık kısım tüm *B.bovis* izolalarında beklendiği şekilde özgül olarak çoğaltılırken, kullanılan diğer türlere ait DNA örnekleri ile her hangi bir çoğalma gözlenmemiştir (Resim 3.B.2, E). Son olarak bovar3A ve bovar3B primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda (Resim 3.B.2, F ve G) tüm *B. bovis* izolatlarında sırasıyla 243 ve 103 bp'lık bölgeler beklendiği şekilde çoğaltılmış, ancak bovar3A primer çifti kullanılarak yapılan PZR' da çoğu izolatta  $\approx$ 350 ve 450 bp uzunlukta özgül olamayan bantlar oluşmuştur. PZR'da kullanılan *A. marginale* haricindeki diğer türlere DNA örneklerinde özgül olamayan çoğalma görülmezken, bovar3B primer çifti *A. marginale* ile  $\approx$ 250 ve 800 bp uzunlukta iki ve bovar3B primer çifti ise sadece  $\approx$ 800 bp uzunlukta bir özgül olamayan bant oluşturmuştur.

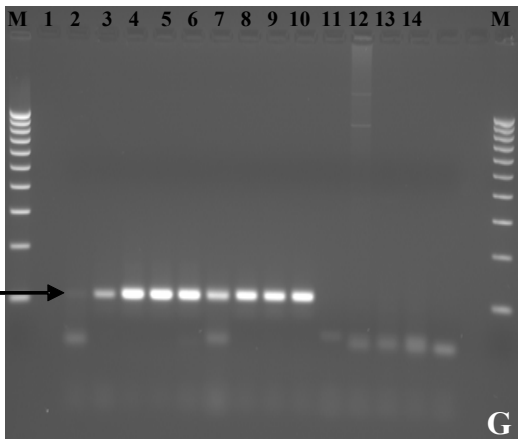
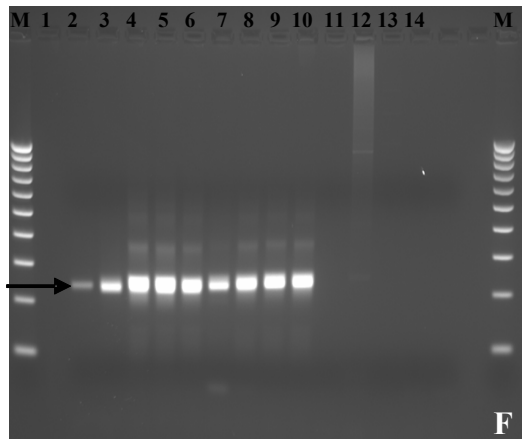
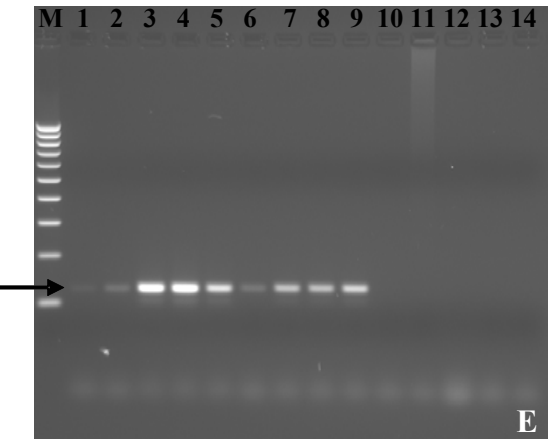
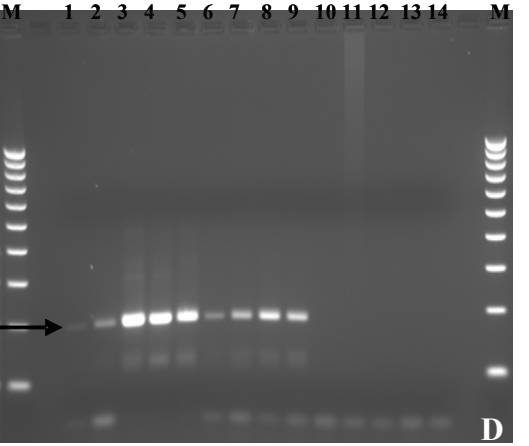
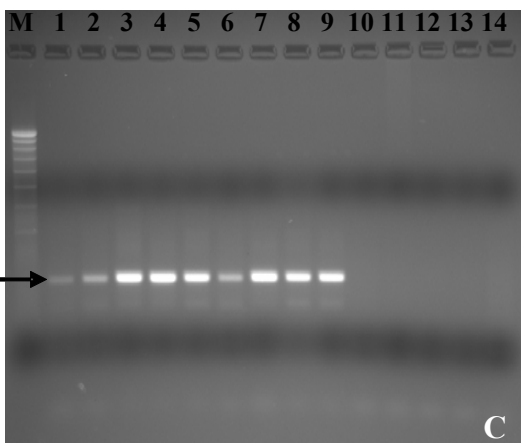
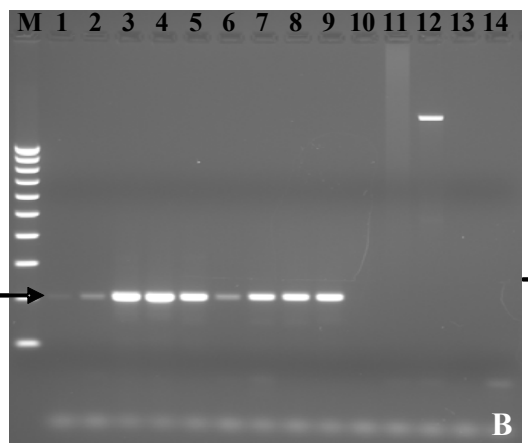
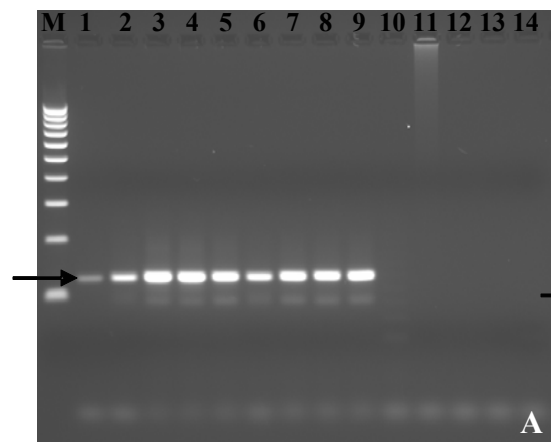


**Resim 3.B.1.** *Anaplasma marginale*'nin teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan MAR1bA (A), MAR1bB1 (B), MAR1bB2 (C), MARorFX (D) ve MARorFY (E) primer çiftlerinin tekli PZR ile özgüllüklerinin belirlenmesi (*Devam*),

**Resim 3.B.1.** *Anaplasma marginale*'nin teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan MAR1bA (A), MAR1bB1 (B), MAR1bB2 (C), MARorfX (D) ve MARorfY (E) primer çiftlerinin tekli PZR ile özgülüklerinin belirlenmesi. M, 100 bp'lik moleküler boyut belirleyici (Invitrogen™); kuyu 1, *A. marginale* Aydın; kuyu 2, *A. marginale* St.Maries; kuyu 3, *A. centrale*; kuyu 4; *A. centrale*; kuyu 5, *T. annulata*; kuyu 6, *B. bovis*; kuyu 7, PZR kontrol (su). **Oklar** MAR1bA (A), MAR1bB1 (B), MAR1bB2 (C), MARorfX (D) ve MARorfY (E) primer çiftleri ile çoğaltılan sırasıyla 92, 382, 265, 181 ve 231 bp'lık bölgeleri göstermektedir.



Tasarlanan primer çiftlerinin yapılan PZR ile belirlenen özgüllükleri, GC miktarları,  $T_m$  değerleri, çoğalttıkları ürünlerin uzunlukları karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.B.1). Bir sonraki aşama olan gradient PZR'da kullanılmak üzere *A. marginale*'ye özgü MARorfX, MARorfY, MAR1bB2 ile *B. bovis*'e özgü olan bovar1 ve bovar2A primer çiftleri belirlenmiştir. Yapılan gradient PCR sonucunda cyto1, MAR1bB2 ve bovar2A primer çiftlerinin multipleks PZR ile *T.annulata*, *A. marginale* ve *B. bovis* türlerinin eş zamanlı tespitinde kullanılmıştır. Bu amaçla belirlenen primer çiftlerinin (cyto1, MAR1bB2 ve bovar2A) oligo analiz bilgisayar programı ([www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware](http://www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware)) ile yapılan analizleri sonucunda (Çizelge 3.B.2) tasarlanan diğer primer çiftlerine kıyasla cyto1 ileri yönlü primerinin %38.1 ile en düşük GC miktarına, 54°C'lik  $T_m$  değerine ve -6,07 kcal/mol ile en yüksek kendine bağlanma olasılığına sahip olduğu belirlenmiştir. Cyto1 ileri yönlü primerinin GC miktarı ile  $T_m$  değeri multipleks PZR'da kullanılacak olan diğer primer çiftlerinden anlamlı bulunmamış ve PZR'da kullanılan karışımdaki  $MgCl_2$  ile primer konsantrasyonda yapılan optimizasyondan sonra bu primerin hedef DNA bölgesine bağlanamama riski ortadan kaldırılmıştır. *B. bovis*'in çoğaltılmasında kullanılan bovar2A primer çiftlerinin hiçbirinde kendine bağlanma olasılığı belirlenmemiş ve MAR1bB2 ile cyto1 ileri yönlü primerlerinin bu olasılık oldukça düşük çıkmıştır. Bununla birlikte cyto b1 geri yönlü primeri -3.64 kcal/mol ile en yüksek kendine bağlanma olasılığı olan primer olduğu belirlenmiştir. Tasarlanan primer çiftlerinden hiçbiri 3' ucunda loop oluşturma riski taşımadığı, bovar2A ileri ve MAR1bB2 geri yönlü primer çiftlerinin -7.39 kcal/mol ile en yüksek primer-dimer oluşturma olasılığına sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.B.2). Loop oluşumu, kendine bağlanma ve primer-dimer oluşturma gibi riskler multipleks PZR'da kullanılan tampon solüsyon, reaksiyondaki siklus parametreleri, primer, dNTP ve  $MgCl_2$  konsantrasyonlarının optimize edilmesi ile engellenmiştir.

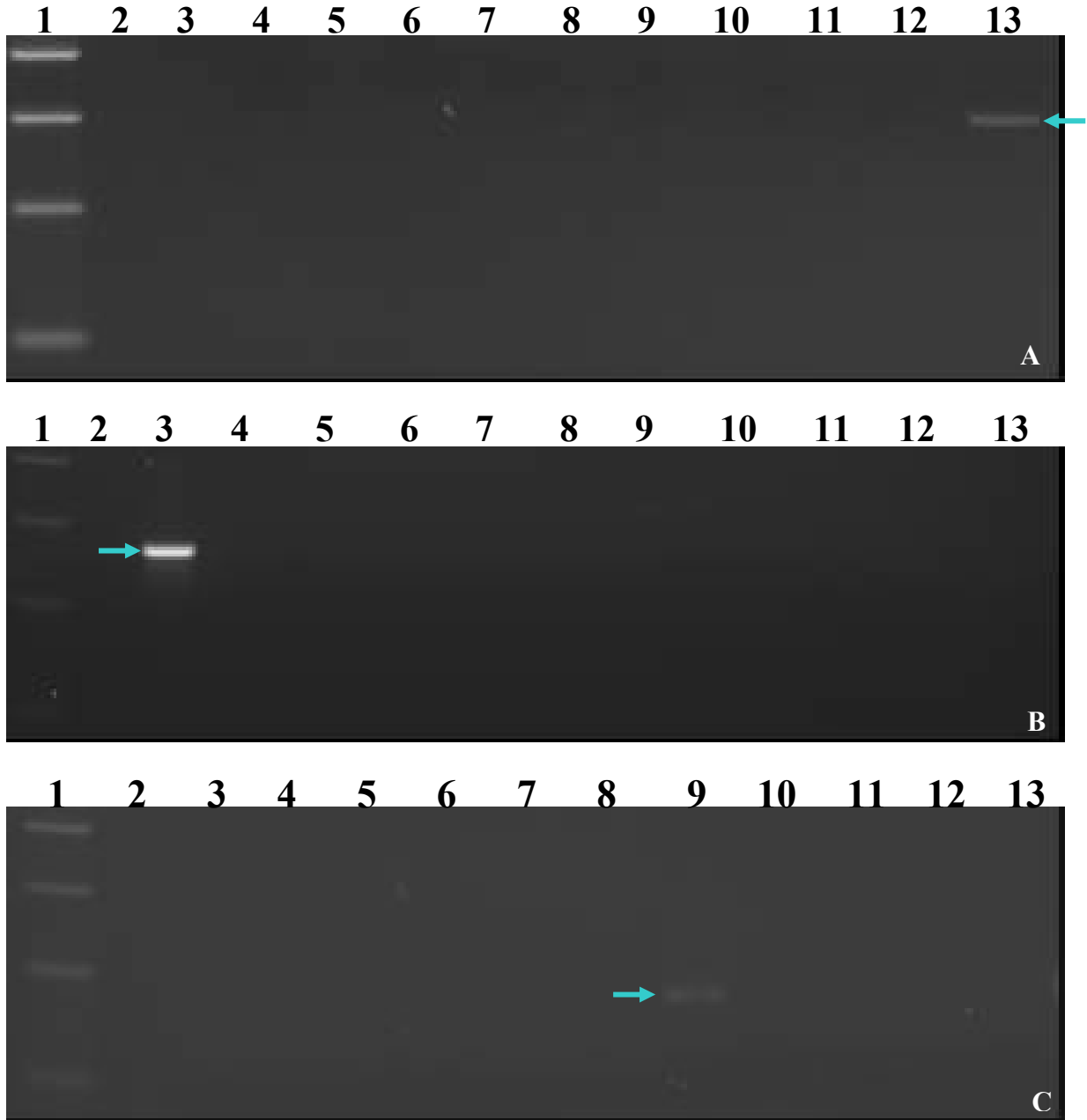


**Resim 3.B.2.** *Babesia bovis*'in teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan bovar1 (A), bovar40S (B), bovar2A (C), bovar2B (D), bovarABC (E), bovar3A (F) ve bovar3B (G) primer çiftlerinin tekli PZR ile özgüllüklerinin belirlenmesi. M, 100 bp' lik moleküler boyut belirleyici (Invitrogen™); kuyu 1, *B. bovis* Meksiko; kuyu 2, *B.bovis* Kusanwyanga; kuyu 3, *B. bovis* M07; kuyu 4; *B.bovis* Lismore; kuyu 5, *B.bovis* Galed saha suşu; kuyu 6, *B. bovis* Gonen saha suşu; kuyu 7, *B.bovis* aşı suşu T; kuyu 8, *B. bovis* aşı suşu MH; kuyu 9, *B. bovis* Aydın; kuyu 10, *T.annulata*; kuyu 11, *A. marginale*; kuyu 12, *A. centrale*; kuyu 13, *B. bigemina*; kuyu 13, PZR kontrol (su). **Oklar;** bovar1 (A), bovar40S (B), bovar2A (C), bovar2B (D), bovarABC (E), bovar3A (F) ve bovar3B (G) primer çiftleri ile çoğaltılan sırasıyla 127, 204, 124, 166, 188, 243 ve 103 bp'lık bölgeleri göstermektedir.

**Çizelge 3.B.2.** Multipleks PZR’da kullanılan primer çiftleri ve bunların oligo analiz programı (1.0.2) kullanılarak elde edilen sonuçları

Tür adı	gen adı	Kopya sayısı/ genom	primer ismi	Çoğaltılan bölgenin boyu (bp)	dizilimi	GC miktarı (%)	Tm (°C)	Kendine bağlanma (kcal/mol)	loop oluşumu (kcal/mol)
<i>B.bovis</i>	Varyant eriroisit yüzey Ag-1 alfa alt ünitesi geni	72	bovar2A	<b>166</b>	For; CAAGCATAACAACCAGGTGG	52.6	56.7	-1,81	yok
					Rev; ACCCCAGGCACATCCAGCTA	60	61.4	-3,13	yok
<i>A.marginale</i>	major yüzey protein 1B kodlayan gen		MAR1bB2	<b>265</b>	For; GCTCTAGCAGGTTATGCGTC	55	59.4	-1,88	-1,76 5' -GCTCTAGCAGG     T ' -CTGCGTAT
					Rev; CTGCTTGGGAGAATGCACCT	55	59.4	-3,84	-1,76 5' -CTGCTTGGG     : ) 3' -TCCACGTAAGA
<i>T. annulata</i>	sitokrom b	bilinmiyor	cyto1	<b>312</b>	For; ACTTTGGCCGTAATGTAAAC	38.1	54	-6,07	-0,56 5' -ACTTTGGCCGT     : ) 3' -CAAATTGTAA
					Rev; CTCTGGACCAACTGTTTGG	52.6	56.7	-3,76	-3,64 5' -CTCTGGACCAACT     ) 3' -GGTTTG

Son olarak multipleks PZR’de kullanılacak olan *cyto1*, *MAR1bB2* ve *bovar2A* primer çiftleri *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* türlerine ait 10 DNA örneği ile enfekte olmayan sığır PBM (3.2.1. Gereç ve Yöntem/Deneysel Enfeksiyon) DNA’ sını kullanılarak aynı koşullar altında tekli PZR ile değerlendirilmiştir. *Cyto1*, *MAR1bB2* ve *bovar2A* primer çiftleri ile sırasıyla *T. annulata* Aydın (Resim 3.B.3 (A), sıra 13), *A. marginale* Aydın (Resim 3.B.3 (B), sıra 3) ve *B. bovis* Aydın (Resim 3.B.3 (C), sıra 10) izolatlarına ait belirlenen uzunluktaki bölgeler özgül olarak çoğaltılmış ve diğer türlere ait DNA örneklerinde hiçbir çoğalma görülmemiştir. Belirlenen *cyto1*, *MAR1bB2* ve *bovar2A* primer çiftleri 3.3.1. Gereç ve Yöntem kısmında anlatılan optimize edilmiş koşullarda multipleks PZR ile aşağıda anlatılan örnekler kullanılarak değerlendirilmiştir.



**Resim 3.B.3.** *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* türlerinin Cytob1 (A), MAR1bB2 (B) ve bovar2A(C) primer çiftleri ile ayrı olarak çoğaltılarak özgüllüklerinin belirlenmesi. Kuyu 1, 100 bp'lık moleküler boyut belirleyici (Invitrogen™); kuyu 2, su PCR kontrol; kuyu 3, *A. marginale*; kuyu 4; *A. centrale*; kuyu 5, *A.phagocytophila*; kuyu 6, *T. parva*; kuyu 7, *T. lestoqardi*; kuyu 8, *T. sergenti*; kuyu 9, *B. bovis*; kuyu 10, *B. bigemina*; kuyu 11, *T. equi*; kuyu 12, Enfekte olmayan sığır PBM; kuyu 13, *T. annulata*. **Oklar** sırasıyla Cytob1F /Cytob1R (A), bovar2A F/bovar2A R (B) ve MAR1bB2 F /MAR1b B2 R (C) primer çiftleri ile çoğaltılan 312, 265 ve 166 bp'lık bölgeler.

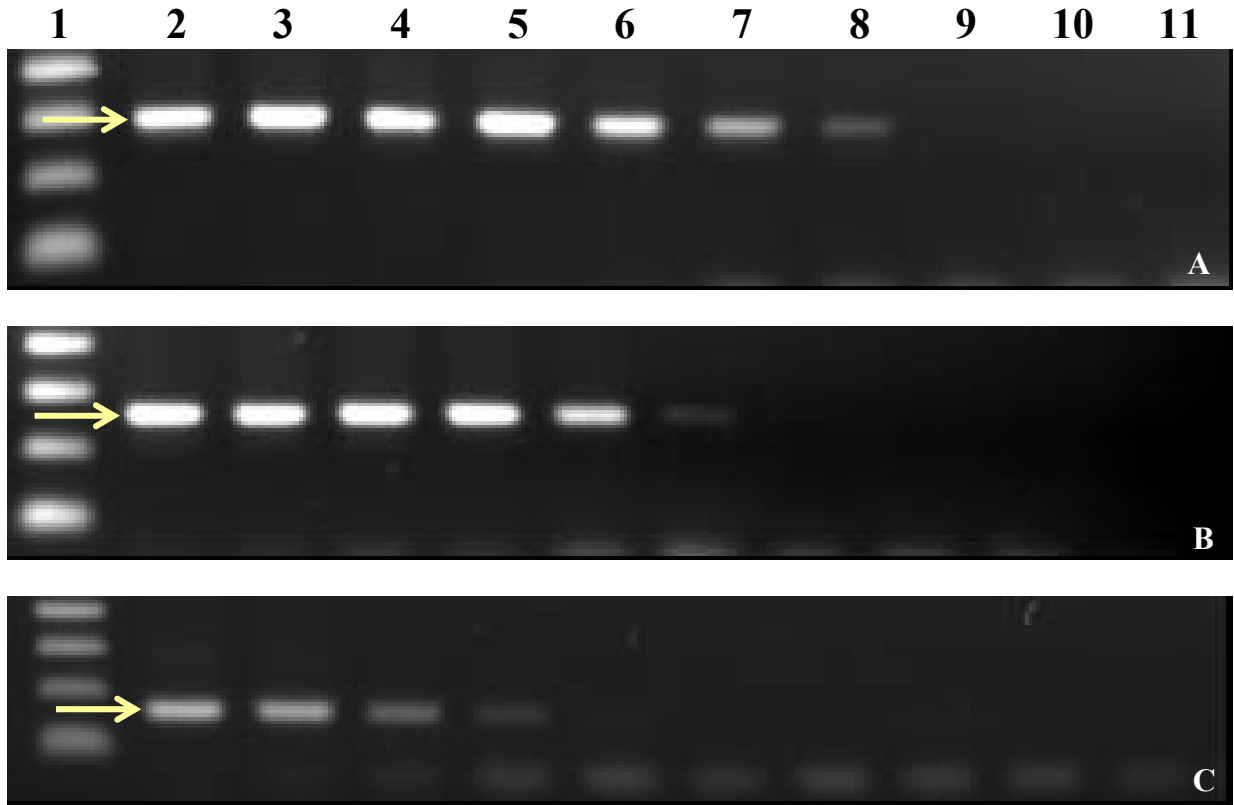
### 3.3.2.3. Tekli ve Multipleks PZR' nun Duyarlılıkları

Cytob1, MAR1bB2 ve bovar2A prime çiftleri kullanılarak yapılan tekli ve multipleks PZR'larının duyarlılıkları *B. bovis* aşısı şusu T, *A. marginale* St. Maries ve *T. annulata* Ankara/D7 izolatlarına ait eşit molariteye sahip DNA'ların ayrı ayrı 10 katlı sulandırmaları ile içerisinde eşit miktarlardaki *B. bovis* aşısı şusu T, *A. marginale* St. Maries ve *T. annulata* Ankara/D7 DNA'ları bulunan karışımın 10 katlı sulandırmaları kullanılarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.B.3). Optimize edilen multipleks PZR'u her türe ait DNA'lar için ayrı ayrı hazırlanan sulandırmalar (Resim 3.B.4) ve tüm türlere ait eşit miktarda DNA içeren karışımdan hazırlanan sulandırmalar (Resim 3.B.5) ile *T. annulata*, *A. marginale* ve *B. bovis* DNA'larını sırasıyla  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  ve  $10^{-5}$  olacak şekilde eşit duyarlılıkta tespit etmiştir. Buna ek olarak, tüm türlere ait eşit miktarda DNA içeren karışımdan hazırlanan sulandırmalar kullanılarak yapılan tekli PZR'da *T. annulata*, *A. marginale* ve *B. bovis* DNA'larını multipleks PZR ile aynı duyarlılıkta tespit etmiştir. Bununla birlikte, her türe ait DNA'lar için ayrı ayrı hazırlanan sulandırmalar kullanılarak her türe özgü primer çifti ile yapılan tekli PZR sonucunda *T. annulata*, *A. marginale* ve *B. bovis* türlerinin duyarlılıkları sırasıyla  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  ve  $10^{-6}$  ya kadar yükselmiştir (Çizelge 3.B.3). Bu sonuçlar bize hayvanlarda görülen eş zamanlı enfeksiyonların tespitinde multipleks PZR'nun duyarlılığında tekli PZR ile karşılaştırıldığında herhangi bir azalma olmadığını göstermektedir. Ancak tekli PZR'nun *T. annulata*, *A. marginale* ve *B. bovis* türlerine ait eşit miktarda DNA içeren karışımdan hazırlanan sulandırmalardaki duyarlılığı her türe ait DNA'lar için ayrı ayrı hazırlanan sulandırmalarla karşılaştırıldığında miks enfeksiyonlarda tekli PZR'unun duyarlılığında azalma görülmüştür.

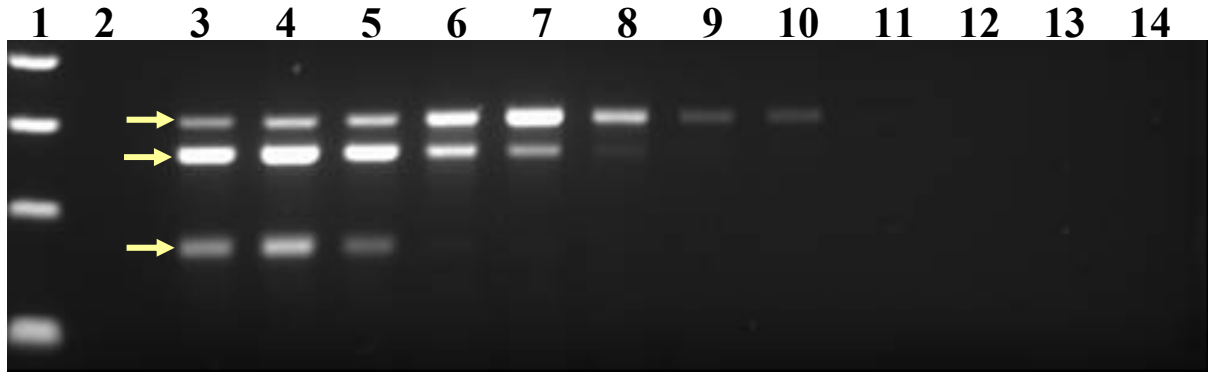
**Çizelge 3.B.3.** Cytob1, bovar2A ve MAR1bB2 primer çiftlerinin tekli PZR ve multipleks PZR yöntemleri ile belirlenen duyarlılıklarının karşılaştırılması.

10 katlı sulandırmalar	Tekli PZR			Multipleks PZR
	Cytob1	Mar1bB2	Bovar2A	
<i>T. annulata</i> dilüsyonu	10 <sup>-10</sup>	-	-	10 <sup>-8</sup>
<i>A. marginale</i> dilüsyonu	-	10 <sup>-9</sup>	-	10 <sup>-7</sup>
<i>B. bovis</i> dilüsyonu	-	-	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>
Miks DNA dilüsyonunda <i>T. annulata</i>	10 <sup>-8</sup>	-	-	10 <sup>-8</sup>
Miks DNA dilüsyonunda <i>A. marginale</i>	-	10 <sup>-7</sup>	-	10 <sup>-7</sup>
Miks DNA dilüsyonunda <i>B. bovis</i>	-	-	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>

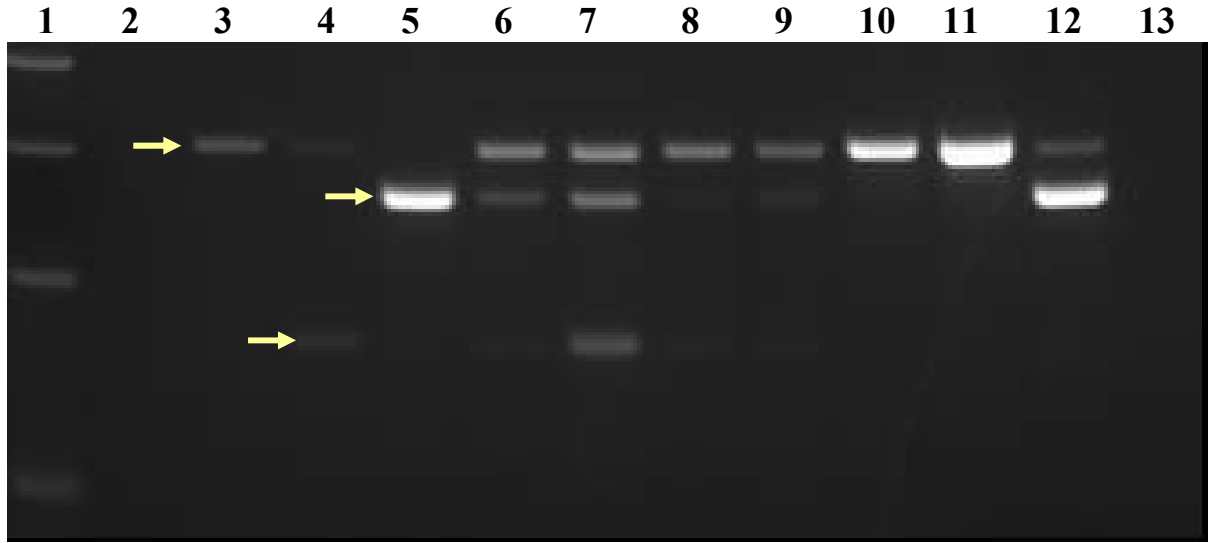




**Resim 3.B.4.** *Theileria annulata* Ankara/D7 (A), *A. marginale* St. Maries (B) and *B. bovis* aşı suşu T (C) DNA'larının her birinin 10 katlı sulandırılarak elde edilen sulandırmalar kullanılarak yapılan multipleks PCR sonuçları. Kuyu 1, 100 bp'lik moleküler boyut belirleyici (Thermo elect. corp.); kuyu 2 – 11, *T. annulata* Ankara/D7 (A), *A. marginale* St. Maries (B) ve *B. bovis* aşı suşu T (C) ait her bir DNA örneğinin  $10^{-1}$ 'den  $10^{-10}$ 'a kadar olan 10 katlı sulandırmaları. **Oklar** sırasıyla Cytob1F/Cytob1R (A), bovar2AF/bovar2A R (B) ve MAR1bB2F /MAR1b B2 R (C) primer çiftleri ile çoğaltılan 312, 265 ve 166 bp.



**Resim 3.B.5.** *Theileria annulata* Ankara/D7, *B. bovis* T aşısı suşu İsrayil ve *A. marginale* St. Maries DNA karışımı kullanılarak yapılan multipleks PCR' in sensitivitesinin belirlenmesinde ethidyum bromid ile boyanmış agaroz gel (% 2,5) elektroforez görüntüsü. Kuyu 1, 100 bp'lık moleküler boyut belirleyici (Thermo elect. corp.); kuyu 2, su kontrolü; kuyu 3–13,  $10^{-1}$ 'den 10 katlı olarak  $10^{-11}$ 'e kadar sulandırılmış miks DNA örnekleri; kuyu 14, enfekte olmayan sığır PBM. **Oklar** yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla Cytob1F/Cytob1R, bovar2A F/bovar2A R ve MAR1bB2 F/ MAR1bB2 R primer çiftleri ile çoğaltılan 312, 265 ve 166 bp'lık bölgeler.



**Resim 3.B.6.** Sahadan toplanan bazı DNA örnekleri kullanılarak yapılan multipleks PCR sonuçlarının ethidyum bromid ile boyanmış agaroz gel (% 2,5) görüntüsü. Kuyu 1, 100 bp'lık moleküler boyut belirleyici (Invitrogen™); kuyu 2, su kontrolü; kuyu 3–13, endemik bölgeden toplanan saha örnekleri. **Oklar** yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla Cytob1F/Cytob1R, bovar2AF/bovar2AR ve MAR1bB2F/MAR1bB2R primer çiftleri ile çoğaltılan 312, 265 ve 166 bp'lık bölgeler.

#### 3.3.2.4. Saha Şartlarından Toplanan Kan Örneklerinin Değerlendirilmesi

Aydın ili ve buna bağlı ilçelerdeki hayvanlardan toplanan 73 kan örneği *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* enfeksiyonları yönünden tekli ve multipleks PZR ile değerlendirilmiş ve DNA örneklerinden elde edilen tekli ve multipleks PCR sonuçları Çizelge 3.B.4'de verilmiştir. Cyto b1, MAR1bB2 ve bovar2A primer çiftleri kullanılarak ayrı ayrı yapılan tekli PZR ile test edilen 73 hayvandan 51 tanesinde *T.annulata*, 16 tanesinde *A.marginale* ve 25 tanesinde ise *B.bovis* enfeksiyonuna rastlanmıştır. Aynı DNA örnekleri ile cyto b1, MAR1bB2 ve bovar2A primer çiftleri kullanılarak yapılan multipleks PZR sonucunda 73 hayvandan 39 tanesinde sadece *T. annulata*, bir tanesinde sadece *A. marginale* ve 17 tanesinde sadece *B. bovis* enfeksiyonu, geriye kalan 4, 8 ve 4 hayvanda sırasıyla *T.annulata/A. marginale/B. bovis*, *T. annulata/A. marginale* ve *A. marginale/B. bovis* şeklinde eş zamanlı enfeksiyon tespit edilmiştir. Yapılan tekli PZR ile bir hayvanda sırasıyla *T.annulata* ve *A. marginale* enfeksiyonu tespit edilmiş, ancak aynı örnek kullanılarak yapılan multipleks PZR sonucunda sadece *T. annulata* enfeksiyonu tespit edilmiştir. Bir diğer DNA örneğinde yapılan tekli PZR ile sadece *T. annulata* enfeksiyonu tespit edilirken, aynı örnek kullanılarak yapılan multipleks PZR sonucunda *T. annulata* ve *A. marginale* enfeksiyonları eş zamanlı olarak tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak multipleks PZR'da yapılan tekli PZR ile negatif sonuç veren bir hayvanda *A. marginale* enfeksiyonuna rastlanılmıştır. Sahadan toplanan DNA örnekleri kullanılarak yapılan multipleks PCR sonuçlarının bir kısmına ait ethidyum bromid ile boyanmış agaroz jel sonuçları Resim 3.B.6'da gösterilmektedir.

**Çizelge 3.B.4.** Saha şartlarında toplanan DNA örneklerinden elde edilen tekli ve multipleks PCR sonuçları.

	Pozitif hayvan sayısı						Negatif hayvan sayısı	Toplam hayvan sayısı
	<i>T.annulata</i>	<i>A.marginale</i>	<i>B.bovis</i>	<i>T.a/B.bov./A.marg.</i>	<i>T.a/A.marg.</i>	<i>B.bov./A.marg.</i>		
<b>Tekli PZR</b>								
cytob1	51						22	73
MAR1bB2		16					57	73
bovar2A			25				48	73
<b>Multipleks PZR</b>	39	1	17	4	8	4	1	73

### 3.3.2.5. Multipleks PZR ile çoğaltılan Ürünlerin Dizilim Sonuçları

Cytob1, MAR1bB2 ve bovar2A primer çiftleri kullanılarak multipleks PZR ile çoğaltılan her türe özgü ürünlerin dizilim analizleri sonucunda elde edilen nükleotid dizilimleri Şekil 3.B.5’de gösterilmiştir. Çoğaltılan ürünlerin nükleotid dizilim sonuçları nükleotid blast programı kullanılarak NCBI veri tabanında kontrol edilmiş ve cyto b1 primer çifti ile çoğaltılan 312 bp’lık ürün *T.annulata* sitokrom b genine %99 ve MAR1bB2 primer çifti ile çoğaltılan 231 bp’lık ürün *A. marginale*’nin *msp1β* genine %100 oranında benzerlik göstermiştir (Şekil 3.12, A ve B). Bovar2A primer çifti kullanılarak çoğaltılan 166 bp’lık ürün *B. bovis*’ in *vesa-1α* gen bölgesine %92 benzerlik göstermiştir (Şekil 3.12 C). Bovar2A primer çiftleri ile çoğaltılan üründe diğer dizilim sonuçlarına nazaran daha düşük benzerlik görülmesi *vesa-1α* ailesinde bulunan gen bölgeleri arasında görülen yüksek nükleotid polimorfizimine (Şekil 3.B.2) bağlıdır, ancak yüksek polimorfizm göstermesine rağmen gen bölgesini çoğaltmada kullanılan primer çiftlerinin gen üzerindeki bağlanma bölgeleri oldukça korunmuştur (Şekil 3.B.2, C).

(A) cyto1 forward primer 156  
 1 primer  
 Tap ACTTTGGCCGTAATGTTAAACATTGTTTCGGTTGGTTTGTTCGTCCTTTATCACTCGTTTGGAGTTTCGTTTTATTTCTCTTTATGTTTCTACATATCATGAAAGGTATGTGGTATTCTAGTAATCATTTACCTTGGTCTTGGTATTCTGGTGT  
 D7 ACTTTGGCCGTAATGTTAAACATTGTTTCGGTTGGTTTGTTCGTCCTTTATCACTCGTTTGGAGTTTCGTTTTATTTCTCTTTATGTTTCTACATATCATGAAAGGTATGTGGTATTCTAGTAATCATTTACCTTAGTCTTGGTATTCTGGTGT  
 \*\*\*\*\*  
 157 cyto1 reverse primer 312  
 Tap GTTATTTTCGTTTTAAGTATAGCAACTGCCTTTGTTGGTTATGTATTACCAGATGGTCAAATGAGCTTCTGGGAGCTACAGTCATAGGTGGTTTATTGAAATTTTTCGGAAAAGCTAATGTTCTAATTTTGGAGGCCAAACAGTTGGTCCAGAG  
 D7 GTTATTTTCGTTTTAAGTATAGCAACTGCCTTTGTTGGTTATGTATTACCAGATGGTCAAATGAGCTTCTGGGAGCTACAGTCATAGGTGGTTTATTGAAATTTTTCGGAAAAGCTAATGTTCTAATTTTGGAGGCCAAACAGTTGGTCCAGAG  
 \*\*\*\*\*

(B) MAR1bB2 forward primer 156  
 1 primer  
 Seq. GCTCTAGCAGGTTATGCGTCAGTTGAACAGCTAGAAGAAGCAAAGGCAGCAGAGGGCACAGGCTGAGCAGCAAGCTGAAGAACAAGCAATGACCAAGAGTGTGGCAGAGGAGCGTGACGCAACAGTTGCTGCAGGGACTGAAACCATTAAGACC  
 AM90 GCTCTAGCAGGTTATGCGTCAGTTGAACAGCTAGAAGAAGCAAAGGAAGCAGCAGGGTACAGGCTGAGCAGCGAGCTGAAGCACAAGCAATGACCGAGCGTGTGGCAGGGGAGCGTGACGCAACAGTTGCTGCAGGGACTGAAACCATTAAGACC  
 AM98 GCTCTAGCAGGTTATGCGTCAGTTGAACAGCTAGAAGAAGCAAAGGAAGCAGCAGGGTACAGGCTGAGCAGCGAGCTGAAGCACAAGCAATGACCGAGCGTGTGGCAGGGGAGCGTGACGCAACAGTTGCTGCAGGGACTGAAACCATTAAGACC  
 \*\*\*\*\*  
 157 MAR1bB2 reverse primer 265  
 Seq ATCGTCAGCGATATGCGGAATGAGCTTGCCTAAAGGGCATGAACAGCTTACAGCTCGTCATCACCAGATATGTGTAATGAGCTTGACAAAATAGGTGCATTCTCCCAAGCAG  
 AM90 ATCGTCAGCGATATGCGGAATGAGCTTGCCTAAAGGGCATGAACAGCTTACAGCTCGTCATCACCAGATATGTGTAATGAGCTTGACAAAATAGGTGCATTCTCCCAAGCAG  
 AM98 ATCGTCAGCGATATGCGGAATGAGCTTGCCTAAAGGGCATGAACAGCTTACAGCTCGTCATCACCAGATATGTGTAATGAGCTTGACAAAATAGGTGCATTCTCCCAAGCAG  
 \*\*\*\*\*

(C) bovar2A forward primer 156  
 1 primer  
 Seq CAAGCATAACAACCAGGTGGTCCACTACATTAGGGCTCTATTCTACCAGTTGTACTTCCCTTAGGAAGCAATGTGCCGTGAAGGTCACTTGTGGAGGAAAATGGCGTGAATGTAGGTATGGGGATGGAGTGCCTGGGAGGGATGTAGTTAGCTGGATG  
 BV1 CAAGCATAACAACCAGGTGGTACACTACATTAGGGCTCTGTTCTACCAGTTGTACTTCCCTTAGGAAGCAATGTGCAGTAAAGTTACTTGTGGAGGTAATGGCGTGAGTGTAGGTATGGTAGTGGAGTGCCTGGAAAGGATGTAGTTAGCTGGATG  
 BV2 CAAGCATAACAACCAGGTAGTTCACTACATTAGGGCTCTGTTCTACCAACTATACTTCCCTTAGGAAGCAATGTGCAGTAAAGTTACTTGTGGAGGCAATGGAGAGAGTGTAGGTATGGGGATGGAGTGCCTGGAAAGGATGTAGTTAGCTGGATG  
 BV3 CAAGCATAACAACCAGGTGGTACACTACATTAGGGCTCTGTTCTATCAACTATACTTCCCTTAGGAAGCAATGTGCTGTGAAAGTCACTTGTGGAGGCAATGGCGTGAGTGTAGGTATGGAAATGGGGTACTTGGGAAGGATGTAGTTAGCTGGATG  
 BV4 CAAGCATAACAACCAGGTGGTACACTACATTAGGGCTCTATTCTACCAACTCTATTTCCCTTAGGAAGCAATGTGCAGTAAAGTTGGCTTAGGAGGGAATGGCGTGAATGTAGGTATGGTAAAGATGTGCTTGGGAAGGATGCCATTAGCTGGATG  
 BV5 CAAGCATAACAACCAGGTGGTCCACTACATTAGGGCTCTATTCTATCAACTCTATTTCCCTTAGGAAGCAATGTGCCGTGAAGGTTGCTTGTGGAGGTAATGGCGTGAGTGTAGGTATGGCAAGGATGTGGAGTCTAAGGGGTAATTAGCTGGATG  
 BV6 CAAGCATAACAACCAGGTGGTCCACTACATTAGGGCTCTATTCTACCAACTCTATTTCCCTTAGGAAGCAATGTGCAGTAAAGTTGACTTGTGGAGGCAATGGCGTGAGTGTAGGTATGGTAAAGATGTGGTGTCCAAGGGGTCATTAGCTGGATG  
 BV7 CAAGCATAACAACCAGGTGGTCCACTACATTAGGGCTCTGTTCTACCAACTCTACTTCCCTTAGGAAGCAATGTGCAGTAAAGTTGACTTGTGGAGGCAATGGCGTGAGTGTAGGTATGGGGATGGAGTAGAGTCAAAGGGGTTATTAGCTGGATG  
 BV8 CAAGCATAACAACCAGGTGGTACACTACATTAGGGCTCTGTTCTATCAGTTGTACTTTCTTAGGAAGCAATGTGCAGTAAAGTTGACTTGTGGAGGCAATGGCGTGAGTGTAGGTATGGTCAGGGGTTGGTATCCAAGGGGTAATCAGCTGGATG  
 \*\*\*\*\*  
 157 166  
 Seq TGCCTGGGGT  
 BV1 TGCCTGGGGT  
 BV2 TGCCTGGGGT  
 BV3 TGCCTGGGGT  
 BV4 TGCCTGGGGT  
 BV5 TGCCTGGGGT  
 BV6 TGCCTGGGGT  
 BV7 TGCCTGGGGT  
 BV8 TGCCTGGGGT  
 \*\*\*\*\*

Şekil 3.B.5. *Theileria annulata* Ankara/D7 (A), *A.marginale* St.Maries (B) ve *B.bovis* Meksiko (C) türlerine ait gen bölgelerinin sırasıyla cyto1 (312 bp), MAR1bB2 (265 bp) ve bovar2A (166 bp) primer çiftleri kullanılarak multipleks PZR yöntemiyle çoğaltılan gen bölgelerinin dizilim sonuçlarının clustal X (1.83) programı kullanılarak NCBI data bankasındaki ilgili gen bölgeleri ile karşılaştırılması. Cyto1 (312 bp) ve MAR1bB2 (231 bp) primer çiftleri kullanılarak çoğaltılan, sırasıyla *T.annulata*'nın sitokrom b geni (A) ve *A.marginale*'ye ait major yüzey protein 1β geninin (B) mevcut dizilimlerle karşılaştırılmasında sırasıyla %99 ve %100 nükleotid benzerliği, bovar2A (181 bp) primer çifti kullanılarak çoğaltılan *B.bovis*'e ait değişken eritrosit yüzey antijen-1 alfa alt ünitesini kodlayan geninde (C) ise %92'lik benzerliğin gösterilmesinde kullanılan ve '\*' işareti ile belirtilen bazlar aynı olan baz çiftlerini gösterir. **Gölgelenmiş bölgeler** (A, B, C) ilgili geni çoğaltmada kullanılan primer çiftlerinin yerlerini göstermektedir.

### 3.3.3. Tartışma

Keneler tarafından bulaştırılan hastalıklar arasında *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* türlerinin yol açtığı tropical theileriosis, bovine babesiosis ile anaplasmosis sığır yetiştiriciliği ve hayvan sağlığı yönünden ekonomik kayıplara yol açan en önemli hastalıklardır (Jongejan ve Uilenberg 1994). *B. bovis* ve/veya *A. marginale* türleri tarafından oluşturulan akut hastalıktan kurtulan hayvanlar re enfeksiyonlara karşı direç geliştirerek, hastalık etkenlerini kalıcı olarak vücutlarında taşırlar (Brown ve ark 2006, Kocan ve ark 2000). Bu taşıyıcı hayvanlar ara konak keneler yoluyla enfeksiyonun duyarlı hayvanlara naklinde en önemli rezervuarlardır (Jonsson ve ark 2008, Kocan ve ark 2000). Tropikal theileriosis'de hastalığın akut aşamasını atlatan hayvanlar az sayıda *Theileria* piroplasmlarını uzun süre vücutlarında taşıyıp *Hyalomma* soyuna bağlı vektör kene türleri yoluyla hastalığın diğer hayvanlara yayılmasında epidemiyolojik açıdan en önemli bulaşma kaynağını oluştururlar (Neitz 1957). En önemlisi bahsedilen hastalıkları taşıyan hayvanların endemik olmayan bölgelere nakledilmesi sonucu oluşacak risklerdir. Taşıyıcı konumdaki hayvanlarda eş zamanlı olarak görülebilen bu etkenlerin yaygınlığının belirlenip yeni kontrol stratejileri geliştirilmesi amacıyla yapılan epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmak üzere yeni, uygulanabilirliği yüksek, basit ve etkili teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi önem taşımaktadır. Hayvanlarda ekonomik kayıplara yol açan hastalık etkenlerine ait DNA'ların belirlenmesi esasına dayanan ve laboratuvar uygulamalarında son yıllarda geniş kullanım alanı bulan moleküler biyolojik yöntemler etkenlerin ayırıcı tanısının yapılması, bunların kontrolünde uygulanacak üzere yeni metodlar geliştirilmesinde önemli rol oynamaya başlamıştır. Farklı türlere ait hedef DNA bölgelerinin aynı reaksiyonda eş zamanlı olarak çoğaltılması yoluyla tespitine olanak sağlayan multipleks PZR (Markoulatus ve ark 2002, Henegariu ve ark 1997, Edwards ve Gibbs 1994) yöntemi paraziter hastalıkların teşhisi için faydalı bir yöntem olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Harris ve ark 1998, Figueroa ve ark 1993, Figueroa ve ark 1996, Figueroa ve ark 1998, Zarlenga ve ark 2001). Etkili bir multipleks PZR testinin geliştirilmesi çoğaltılacak uygun hedef gen bölgelerinin belirlenmesi ve kullanılan reaksiyon şartlarının optimizasyonuna bağlıdır. PZR'un verimliliği bir ölçüde çoğaltılacak olan gen bölgesinin kopya sayısı ile orantılıdır ve çoklu kopyaya sahip bölgelerin (gen ailelerinin) hedeflenmesi testin duyarlılığının artırılmasında kullanılabilir bir yöntem olduğu söylenmiştir (Criado ve ark 2006). Aynı zamanda tek bir türün belirlenmesi için yapılan tekli PZR'da olduğu gibi multipleks PZR testinde de reaksiyonda kullanılan belirlenecek türlere ait gen bölgelerini çoğaltacak olan her primer çiftinin o bölgeye özgül olması zorunludur.

Bu çalışmada multipleks PZR yöntemi ile çoğaltılacak olan gen bölgeleri *T. annulata* haricindeki türlerde (*B. bovis* ve *A. marginale*) muhtemel çoklu kopyaya sahip gen bölgelerinden seçilmiştir. *T.annulata*'nın teşhisinde hedef bölge olarak seçilen sitokrom b geni bir önceki kısımda (3.2. *Theileria annulata*'nın Hasta ve Taşıyıcı Hayvanlarda PZR yöntemi ile Teşhisi) anlatıldığı üzere mitokondriyal genomda tek kopyalı bir gen olmasına karşın her mitokondriyonun türler arasında ve her türe ait farklı doku ve organlarda değişmekle birlikte 2–10 arasında mitokondriyal genomu sahip olduğu düşünülmektedir (Wiesner ve ark 1992, Bruce ve ark 1994, Voet ve ark 2006). Bu nedenle sitokrom b gen bölgesi *T. annulata*'nın duyarlı ve özgül olarak belirlenmesinde çoğaltılacak gen bölgesi olarak seçilerek multipleks PZR'da kullanılmıştır. Multipleks PZR ile çoğaltıldıktan sonra klonlanarak sekans analizine gönderilen *T. annulata* Ankara/D7 izolatına ait gen dizilim sonuçlarının NCBI veri tabanında kayıtlı genler ile karşılaştırılması sonucunda *T. annulata*/C9 izolatına ait sitokrom b gen bölgesi ile %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.B.5, A). Görülen tek nükleotid farklılığı muhtemelen reaksiyonda kullanılan *Taq* polimeraz enziminden (enzimin 3'–5' ekzonükleaz prova okuma aktivitesi bulunmadığı için çoğalttığı her 9000 nükleotid de bir hata verebilmektedir) kaynaklanan PCR hatası, dizilim analiz hatası yada izolatlar arasında ki farklılık sonucu oluşmuş olabilir.

*Anaplasma marginale* genomunda bulunan *msp1*; *msp1 $\alpha$*  tarafından kodlanan MSP1a ve *msp1 $\beta$*  tarafından kodlanan MSP1b polipeptidler tarafından oluşturulan dimer yapısında bir proteindir. 3.3.2. Bulgular kısmında anlatıldığı üzere *msp1 $\alpha$*  geni tek kopyalı bir gen olup *A. marginale* izolatları arasında uzunluk farklılıkları göstermektedir. *Msp1 $\beta$*  ise ikisi tüm gen, üçüde kısmı gen bölgesi olmak üzere beş genden oluşan küçük bir çoklu kopyalı gen ailesini temsil etmektedir (Kelly ve ark 2004, Barbet ve Allred 1991). Bu genlerin her ikisinde (*msp1 $\alpha$* , *msp1 $\beta$* ) tandem tekrarlı dizilimlerden oluşan alanlar içermesine karşın, bu alanlar *msp1 $\beta$*  geninde *msp1 $\alpha$*  geni kadar yaygın değildir (Barbet ve Allred 1991). MSP1a peptidlerini kodlayan gene ait 2 kb DNA bölgesi kullanılarak *A. marginale*'nin sığırlarda ve vektör kenelerde prob aracılı olarak tespiti için yapılan çalışmada, sığırlarda farklı coğrafik bölgelere ait üç *A. marginale* izolatı ile vektör kenelerde iki izolatın özgül olarak teşhisi yapılmıştır (Goff ve ark 1988). Ayrıca, sığırlarda *A.marginale* enfeksiyonunun *msp1 $\beta$*  genine dayalı teşhisinde kullanılan tag–man gerçek zamanlı PZR (Carelli ve ark 2007) ve nested PZR (Molad ve ark 2006) yöntemleri ile etkenin özgül ve duyarlı tespiti yapılmıştır (Carelli ve ark 2007; Molad ve ark 2006). Tasarlanan primer çiftlerinden MAR1bA ve MAR1bB1 tekli PZR'da *T. annulata* DNA'sı kullanılan örnekte çok sayıda özgül olmayan bant çoğalttığı için multipleks PZR'de kullanılmamıştır. Geriye kalan MARorfX (181 bp), MARorfY (231 bp) ve



MAR1bB2 (265 bp) primer çiftlerinden multipleks PZR'da kullanılmak üzere seçilecek olanlara ait optimal bağlanma ısıları, GC içeriği ve çoğalttıkları ürünlerin boyutları göz önünde tutularak yapılan değerlendirmede MAR1bB2 primer çifti %55 GC içeriği, 59.4 T<sub>m</sub> derecesi, 265 bp'lık çoğalttıkları ürün ve dereceli PZR sonucunda gözlenen geniş bağlanma ısı aralığı ile multipleks PZR'da kullanılacak olan diğer primer çiftleri ile en uyumlu özellikleri göstermiştir. Sonuç olarak *A. marginale* enfeksiyonun sığırlarda multipleks PZR yöntemi ile tespitinde iki *msp1β* geni arasında 265 bp'lık korunmuş bölgenin çoğaltılması için tasarlanan MAR1bB2 primer çifti kullanılmıştır. MAR1bB2 primer çifti ile *A. marginale*'ye ait üç farklı izolatu (Aydın, St. Maries ve kaynağı bilinmeyen bir izolat) özgül olarak çoğaltırken, kullanılan diğer türlere ait DNA örneklerinde herhangi bir çoğalma görülmemiştir (Resim 3.B.1 ve 3.B.3). Klonlanıp sekans analizine gönderilen multipleks PZR'da MAR1bB2 primer çifti ile çoğaltılan 265 bp uzunluğundaki bantın gen dizilimi sonuçları NCBI veri tabanında kayıtlı genler ile karşılaştırıldığında *msp1β* dizimleri (AY84153 and M59845) ile %100 benzerlik göstermiştir (Şekil 3.B.5, B). Elde edilen sonuçlar bize, *A. marginale*'nin farklı coğrafik bölgelere ait izolatlarının tekli ve multipleks PCR ile tespitinde MAR1bB2 primer çiftinin kullanılabilceği göstermiştir. Ancak daha geniş coğrafik alanı temsil eden izolatlar kullanılarak primerlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin belirlenmesi faydalı olacaktır.

*Babesia bovis* genomu VESA1 proteinlerini kodlayan, SmORFs, 40S ribozomal genleri, değişken meroziot yüzey antijenlerini ve ABC taşıyıcı ailesindeki proteinleri kodlayan gen bölgeleri gibi çok sayıca çoklu kopyaya sahip gen ailesini bünyesinde barındırmaktadır (Kelly ve ark 2007, Suarez ve ark 2007). *Ves1* genleri *B.bovis* genomundaki en geniş gen ailesini oluşturur (Kelly ve ark 2007). VESA1; *ves1a* ve *ves1b* gen bölgeleri tarafından kodlanan sırasıyla VESA1 $\alpha$  ile VESA1 $\beta$  alt ünitelerinden oluşan heterodimerik bir moleküldür (Al-Khedery ve Allred 2006). Polipeptid alt üniteleri farklı uzunluklarda ve ayrı antijenik özelliklerdedirler (Allred ve ark 1994). Yapılan genom analizlerinde *ves1* genlerini oluşturduğu kabul edilen 119 gen bölgesi (72 VESA1 $\alpha$ , 43 VESA1 $\beta$  ve sınıflandırılmamış dört gen bölgesi) belirlenmiştir (Kelly ve ark 2007). Bu çalışmada tasarlanan yedi primer çiftinde beş tanesi yukarıda anlatılan *ves1* genlerini oluşturan farklı gen ailelerini çoğaltmak amacıyla tasarlanmıştır. Yapılan değerlendirme sonucunda bovar1, 2B, 3A ve 3B primer çiftleri gerek *B. bovis*'in farklı bölgelere ait izolatları arasında beklenenden daha büyük yada daha küçük boyutlarda ürünler çoğaltmaları gereksede kullanılan diğer türlere ait DNA örnekleri ile özgül olmayan ürünler oluşturmaları sebebiyle multipleks PZR'de kullanılmamıştır. Kalan bovar40S, ABC ve 2A primer çiftleri testin duyarlılığının artırılması amacıyla kendi aralarında özgül olarak tasarlandıkları çok kopyalı gen ailelerinde bulunan

hedef bölge sayısı ve yukarıda bahsedilen kriterlerin karşılaştırılması ile yapılan değerlendirilme sonucunda bovar2A primer çifti multipleks PZR'da değerlendirilmek üzere seçilmiştir. Yapılan tekli PZR'da bovar2A primer çifti *B. bovis*'in farklı coğrafik bölgelere ait dokuz izolatını herhangi bir uzunluk farklılığı göstermeden çoğaltmış ve kullanılan diğer türlere ait DNA örneklerinde herhangi bir ürün çoğaltmamıştır (Resim 3.B.3 (C) ve 3.8). Yapılan multipleks PZR'da bovar2A primer çifti ile çoğaltılan *B. bovis* T aşısı suşu'na ait örneğin yapılan sekans analizi sonucunda elde edilen dizilim NCBI veri tabanında mevcut *B. bovis* vesal $\alpha$  genleri ile karşılaştırıldığında %92 oranında benzerlik göstermiştir (Şekil 3.B.5, C). Yapılan çalışmalarda, VESA1'in konak bağışıklık sisteminden paraziti korunmak için hızlı bir antijenik varyasyon geçirdiği ve hayvanlarda parazit türü ile kronik enfeksiyonların oluşmasına yardımcı olduğu belirlenmiştir (Allred ve ark 2000; O'Connor ve Allred, 2000). Elde edilen sonuçlarda görülen göreceli olarak düşük seviyedeki benzerlikler konak bağışıklık sisteminden korunmada görev alan bu tür yüzey antijenleri kodlayan gen bölgeleri arasında beklenen bir sonuçtur. Bunun yanında kullanılan izolatlarla çoğaltılan ürünlerde herhangi bir uzunluk farklılığı bulunmamakta ve dizilim analiz sonuçları tasarlanan primer çiftinin 23 vesal $\alpha$  genindeki bağlanma bölgelerinin korunmuş olduğunu göstermektedir (Şekil 3.B.5, C). Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında bovar2A primer çiftinin tekli ve multipleks PZR yöntemleri ile hastalığın endemik olarak görüldüğü farklı bölgelerde *B. bovis*'in teşhisinde kullanılabilecek uygun bir gen bölgesi olduğunu göstermiştir.

Multipleks PZR'nda testin duyarlı ve özgül olarak çalışabilmesi için reaksiyonda kullanılan tampon solüsyonun, çoğaltılacak bölgelere özgü primer çiftlerinin, kullanılan dNTP ve magnezyum klorür gibi değişkenlerin konsantrasyonları ile primerleri optimal bağlanma ısılarının belirlenmesi önemlidir (Markoulatus ve ark 2002). Bu çalışmada yukarıda belirtilen değişkenlerin optimal konsantrasyonları deneme yanılma yöntemi ile deneysel olarak belirlenmiştir (Henegariu ve ark 1997). Belirlenen optimal konsantrasyonlar ile cytob1, MAR1bB2 ve bovar2A primer çiftleri kullanılarak yapılan multipleks PZR ile hayvanlarda hem tekli hemde eş zamanlı olarak görülebilen *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* kaynaklı enfeksiyonların özgül olarak teşhisleri yapılabilmektedir. Testin duyarlılığın belirlenmesi amacıyla hazırlanan her türe ait ayrı DNA dilüsyonları ve tüm parazit türlerine ait eşit miktarda DNA örneğini içeren karışımdan (miks DNA dilüsyonu) hazırlanan dilüsyonlar kullanılarak yapılan multipleks PZR ile elde edilen sonuçlar bize testin tekli ve miks dilüsyonlarda tüm türleri eşit duyarlılıkta belirleyebildiğini göstermiştir. Bu sonuçlara tüm parazit türlerine ait eşit miktarda DNA örneğini içeren karışımdan hazırlanan dilüsyonlar ile

tekli ve multipleks PZR’nda elde edilen eşit duyarlılık eklendiğinde reaksiyonda optimal koşulların sağlandığı görülmektedir. Bununla birlikte, her türe ait ayrı DNA dilüsyonları kullanılarak yapılan tekli PZR testi her tür için farklı olmakla birlikte miks dilüsyonlar ile elde edilen sonuçlara kıyasla 10–100 kez arasında değişen oranlarda daha fazla duyarlılık göstermiştir (Çizelge 3.B.3). PZR’da çoğaltılacak hedef DNA’nın başlangıç miktarı reaksiyon sonunda elde edilen ürün miktarı ile orantılı olarak değişmektedir. Multipleks reaksiyonlarda hedef DNA miktarının belli bir seviyenin altında oluşu elde edilen son ürünü azaltmakta ve testin etkinliğini değiştirmektedir (Henegariu ve ark 1997). Bu çalışmada kullanılan dilüsyonlar her ne kadar aynı miktarlar kullanılarak hazırlanmış olsada, içerisinde tek bir türe ait DNA bulunan dilüsyonlardan reaksiyona eklenen DNA miktarı ile miks dilüsyonlardan eklenen her türe ait DNA miktarı hiçbir zaman aynı olmamakta ve reaksiyon sonunda elde edilen ürün miktarıda buna bağlı olarak düşebilmektedir. Aynı zamanda PZR’da kullanılan reaktiflerin (dNTP, *Taq* DNA polimeraz, primer gibi) miktarları sabittir ve multipleks PZR’da birden fazla türe ait hedef bölgenin çoğaltılması esnasında sınırlı miktardaki reaktifler yarışmalı olarak kullanılmaktadır (Edwards ve Gibbs 1994). Tekli PZR’da hedef bölgenin çoğaltılması için kullanılabilir reaktif miktarı ile her ne kadar optimize edilmiş olsa multipleks PZR’da bulunan her türe ait hedef bölgenin çoğaltılmasında kullanılabilir reaktif miktarı arasındaki fark tekli PZR’nun etkinliğini artırıcı yöndedir. Bu çalışmada bilinen parazitemideki enfekte kan örnekleri sağlanamadığı için *B. bovis* ve *A. marginale* türlerine ait purifiye edilmiş parazit DNA’ları ile *T. annulata*’nın in vitro ortamda üretilen hücre kültürlerinden elde edilen DNA örneği kullanılmış ve her sulandırmaya düşen parazit sayısı tam olarak belirlenememiştir. Duyarlılık değerlendirilirken kullanılan dilüye edilmiş parazit DNA’larının genom büyüklükleri, izolasyon metodları, her reaksiyonda kullanılan DNA miktarının pipetasyonu arasındaki farklılıklar gibi bir çok değişken olması nedeniyle elde edilen sonuçlara bakarak testin parazitlerin tespitindeki kesin duyarlılıkları hakkında bir anlam çıkarmak oldukça zordur. Saha şartlarında kullanılmak üzere yeni teşhis yöntemlerinin geliştirilip bunların duyarlılıklarının belirlenmesinde toplanan örneklerden izole edilen DNA’larda bulunan ve PZR’nunda kullanılan polimeraz enzimini inhibe edebilen hemoglobin, myoglobin gibi faktörlerin etkilerinin belirlenmesi oldukça önem taşımaktadır (Thekisoe ve ark. 2009a). Bunlara ek olarak taşıyıcı ve enfekte hayvanlardaki farklı parazit türlerine ait değişken orandaki parazitemi oranlarında testin farklı türler için duyarlılığını etkilenmektedir. Örnek olarak; *B.bovis*, enfekte eritrositlerin dalak geçişini engellemek amacıyla beyin gibi hayati organlardaki mikro kapillar damarlarda sekestrasyona ve hipotansif şoklara sebep olmaktadır (Brown ve ark 2006, Schetters ve ark 1998). Oluşan

sekestrasyona bağlı olarak enfekte hayvanlarda hastalığın klinik bulguları ve gözlenen parazitemi arasında her hangi bir korelasyon görülmemektedir (Brown ve ark 2006, Schetters ve ark 1998). Bu durum saha şartlarında *B.bovis* ile enfekte hayvanlarda genelde düşük düzeyde parazitemi şeklinde görülmekte, taşıyıcı konumdaki hayvanlarda ise parazitemi seviyesi oldukça azalmaktadır. Hem tekli hemde miks dilüsyonlar kullanılarak yapılan değerlendirmede *T. annulata* ve *A. marginale* ile karşılaştırıldığında *B. bovis*'in duyarlılığı daha düşük çıkması parazite ait purifiye DNA örneği kullanıldığı için yukarıda bahsedilen sebebe bağlamak oldukça zordur. Bununla birlikte *T. annulata* (8.35 Mb) ve *B. bovis* (8.2 Mb) genomu ile karşılaştırıldığında *A. marginale* (1.2 Mb) oldukça küçük oluşu (Pain ve ark 2005, Kelly ve ark 2007, 2004), *A.marginale* ile *B.bovis* DNA örneklerinin pürifiye edilmiş parazitlerden ve *T. annulata* DNA örneğinin hücre kültürlerinden hazırlanmış olması ve duyarlılığın belirlenmesinde her türe ait eşit konsantrasyonda DNA örneği kullanılması bu olguyu bir ölçüde açıklamaktadır. Buna ilaveten çalışmada tekli ve multipleks PZR ile her tür için belirlenen duyarlılık sonuçlarında buna bağlı olarak göreceli olmakla birlikte aşağıda bahsedildiği üzere doğal ortamda hastalığa duyarlı hayvanlardan toplanan saha örneklerinde yapılan değerlendirmede elde edilen sonuçlar tekli ve multipleks PZR'larının hastalığa yol açan türlerin belirlenmesinde %97 oranında aynı sonuçları vermiş ve bir ölçüde bahsedilen sakıncaları gidermiştir. Multipleks PZR'nun duyarlılığının arttırılması amacıyla uygulanabilecek yöntemlerden biride elde edilen PZR ürünlerinin her türe özgü problemler bağlanarak hazırlanmış membrana blotlama yöntemi ile aktararak değerlendirilmesidir (Figueroa ve ark 1993), ancak bu yöntemle basit, etkili ve özgül olmaktan çıkıp karmaşık bir yöntem haline gelmekte ve oluşabilecek muhtemel kontaminasyon riskide artmaktadır.

*Theileria annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* enfeksiyonlarının endemik olarak görüldüğü Aydın ili ve buna bağlı ilçelerdeki hayvanlardan toplanan kan örnekleri kullanılarak yapılan tekli ve multipleks PZR ile elde edilen sonuçlar her iki testinde etkenlerin teşhisinde (iki örnekte elde edilen sonuçlar haricinde) eşit duyarlılık göstermiştir (Çizelge 3.B.4). Bu iki örnekten birinde tekli PZR ile *T. annulata* ve *A. marginale* etkenleri tespit edilmiş, ancak yapılan multipleks PZR ile sadece *T. annulata* belirlenirken *A. marginale* tespit edilememiştir. Diğer örnekte bunun tam zıttı olarak yapılan tekli PZR ile sadece *T. annulata* tespit edilirken, multipleks PZR ile *T. annulata* ve *A. marginale* türleri belirlenmiştir. İki test arasında görülen bu uyumsuzluk kullanılan örneklerdeki düşük düzeyde *A. marginale* DNA'sı bulunmasından kaynaklanma olasılığı yüksektir. Yapılan çalışmalarda, düşük parazitemili örneklerinde bu tür hataların beklenebileceği, çünkü parazitemi oranında azalmaya bağlı olarak etkenlerin teşhis sıklığında azalma olabildiği belirtilmiştir (Calder ve ark 1996, Martins

ve ark 2008). Ayrıca içinde birden fazla türe ait DNA bulunan örneklerde, bir türe ait DNA miktarı diğer türe ait DNA miktarına oranla düşük seviyelerde ise pipetleme esnasında her türe ait DNA örneğinden eşit miktarda alınamama olasılığı oldukça yüksektir. Multipleks PZR ile değerlendirilen 73 hayvandan dört tanesinin *T. annulata*, *A. marginale* ve *B. bovis*, sekizinin *T. annulata/A. marginale* ve dördünün *A. marginale/B. bovis* türleri ile enfekte oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca 73 hayvanın 39, 17 ve bir tanesinde sırasıyla *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* türleri ile tekli enfeksiyon tespit edilmiştir. Serolojik yöntemler kullanılarak yapılan çalışmada, Aydın yöresindeki sığırlarda tropikal theileriosis'in yaygın olarak görüldüğü belirtilmiştir (Aysul ve ark 2008), bu çalışmada elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde tropikal theileriosis enfeksiyonuna yakalınmış hayvan sayısı toplam hayvan sayısının %86.3'lük dilimini oluşturarak bölgede görülen en yaygın kene kökenli hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Sığır babesiosisi ile anaplasmosisi ise sırasıyla %45,2 ve %23,2'lik oranlarla tropikal theileriosisi takip etmektedir. *T. annulata* ile diğer türler karşılaştırıldığında özellikle *A. marginale* türünün prevalansı oldukça düşüktür. Anaplasmosis'de hastalığın akut dönemini atlatan hayvanlar etkeni kalıcı olarak vücutlarında taşırlar, ancak bu hayvanlarda düşük seviyelerden tespit edilemeyen seviyelere kadar değişen devirli bir parazitemi görülür (Kocan ve ark 2000), yani taşıyıcı hayvanlardaki parazitemi seviyesi yıl içinde belli dönemlerde artarken belli dönemlerde tespit edilemeyen seviyelere kadar azalma eğilimi göstermektedir. Ek olarak, örneklerin toplanma zamanı enfeksiyonlara (tropikal theileriosis, bovine babesiosis ve anaplasmosis) yol açan etkenlerin belirlenmesinde büyük öneme sahiptir. Bu sebeple hastalıkların prevalansı hakkında tam bir bilgi sahibi olunması için daha geniş bir zaman diliminde, belli aralıklarla örnekleme yapılarak bunların multipleks PZR ile değerlendirilmesi gerekmektedir. Aynı zamanda bu çalışmada olduğu gibi çoklu kopyaya sahip gen ailelerini çoğaltmaya dayalı PZR yöntemleri kullanılırken göz önünde bulundurulması gereken önemli etmenlerden biride konak bağışıklık sisteminin etkisi ile kimi populasyonlarda bu bölgelerde oluşabilecek nükleotid farklılaşmalıdır. Ancak bu tür nokta mutasyonlarının tüm populasyona yayılabilmesi için uzun süreye ihtiyaç bulunmaktadır. Sonuç olarak geliştirilen moleküler biyolojik teknikler belli zaman aralıklarında populasyondaki bireyler arasında hedef gen bölgelerinde bu tür mutasyonların oluşup oluşmadığı yönünden kontrol edilmeli ve eğer risk oluşturan bir durum söz konusu ise (hedef gen bölgesinin populasyondaki bireyler arasında giderek artan genetik farklılaşma gibi) populasyondaki bireylere arasında korunmuş farklı gen bölgelerinin kullanılması yoluna gidilmelidir.

Bu çalışmada geliştirilen multipleks PZR yönteminin, sığırlarda önemli hastalık tablosu oluşturan *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* türlerinin yol açtığı ekonomik kayıpların azaltılmasında, hastalığın prevalansının belirlenerek buna karşı yeni kontrol stratejileri oluşturulması amacıyla uygulanan epidemiyolojik çalışmalarda türlerin eş zamanlı ve özgül olarak tespitinde kullanılacak basit ve etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

### 3.4. *T.annulata* DNA'sının Loop Aracılı İzotermal Yöntemle (LAMP) Çoğaltılması

Moleküler biyoloji ve biyoinformasyonu içinde barındıran biyoteknoloji alanında yaşanan yenilikler nükleik asit teknolojisini olası ihtimaller olmaktan çıkarıp hastalık etkenlerinin belirlenmesinde rutin laboratuvar teknikleri ve modelleri haline getirmiştir (Gill ve Ghaemi, 2008). Bu açıdan bakıldığında nükleik asit çoğaltma teknikleri laboratuvarlarda sıkça kullanılan bir teknik olmuş ve bu çoğaltma tekniklerinin başınıda hedef bölgenin (DNA yada RNA) çoğaltılması esasına dayanan PZR çekmiştir. PZR'da basit bir anlatımla; hedef bölgeye 5' ve 3' yönlerinden bağlanan iki oligonükleotid primer çiftinin DNA polimeraz enzimi yardımı ile deoksiribonükleosid-trifosfatların (dNTP'ler) primerlere 3' yönünde eklenerek çoğaltılmak istenen hedef DNA bölgesinin çift zincirli kopyalarının oluşturulmasıdır. PZR'de ısının yükseltilip düşürülmesi ile çift zincirli DNA birbirinden ayrılarak reaksiyonun diğer aşamalarda kullanılacak olan hedef DNA bölgeleri oluşturmaktadır. PZR, araştırmacılar tarafından yoğun olarak kullanılıyor olmasına karşın reaksiyonun oluşup hedef bölgenin çoğaltılmasında termal sikluslu makinelere ihtiyaç olması bu tekniğin saha şartlarına adapte edilip kullanılmasını kısıtlamaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda termal siklusa ihtiyaç duymadan izotermal koşullar altında hedef bölgelerin çoğaltılmasına olanak sağlayan yeni teknikler geliştirilmiştir (Gill ve Ghaemi 2008).

Moleküler biyoloji alanında, DNA/RNA sentezi ve bazı yardımcı proteinler ile bunların in vitro ortamda nükleik asitleri çoğaltabilme özelliklerinin belirlenmesinden sonra birçok PZR tabanlı olmayan yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu izotermal çoğaltma tekniklerinden en iyi bilinenleri arasında, transkripsiyon aracılı çoğaltma (TMA; transcription mediated amplification) ya da kendinden katlamalı dizilim kopyalanması (3SR; self-sustained sequence replication), nükleik asit dizilim tabanlı çoğaltma (NASBA; nucleic acid sequence-based amplification), RNA'nın sinyal aracılı çoğaltılması (SMART; signal mediated amplification of RNA), zincir yerdeğiştirme yoluyla çoğaltma (SDA; strand displacement amplification), çember dönme çoğaltması (RCA; rolling circle amplification), DNA'nın loop aracılı izotermal çoğaltılması (LAMP; loop-mediated isothermal amplification), izotermal çoklu yer değiştirme yoluyla çoğaltma (IMDA; isothermal multiple displacement amplification), helicase tabanlı çoğaltma (HDA; helicase dependent amplification), tek primerli izotermal çoğaltma (SPIA; single primer isothermal amplification) ve çember helicase tabanlı çoğaltma (cHDA; circle helicase dependent amplification) gibi teknikler yer almaktadır (Gill ve Ghaemi 2008).

TMA ve NASBA birbirlerine oldukça benzer tekniklerdir. Her iki yöntemde de hedef RNA'dan DNA sentezlenmesi için RNA polimeraz ile reverse transkriptaz enzimlerinden faydalanılmaktadır. RNA çoğaltma yöntemi bir ileri safhaya geliştirilmiş ve eklenen Rnase enzime yardımı ile ısı denatürasyonuna gerek kalmadan ortamdaki RNA elimine edilmiştir. Bu son anlatılan yöntem termosikluslu cihaza gerek kalmadan izotermal koşullarda çoğalma sağlayabilmektedir (3SR). Bir diğer yöntem olan SMART sinyal çoğalması esasına dayanmakta ve ne termal sıkluslara ne de hedef dizinin kopyalanmasına ihtiyaç duyulmamaktadır. Zincir yer değiştirme yoluya çoğaltmada (SDA) ise restriksiyon endonüklez enzimleri vasıtası ile hedef DNA üzerindeki bölge işaretlenmekte ve bunu takiben ekzonükleaz aktivitesine sahip DNA polimeraz enzimi yardımı ile işaretli bölgenin 3' ucundan başlayarak *Bst* DNA polimeaz yada benzeri zincir yer değiştirme özelliğine sahip bir enzim kullanarak aşağı yönde DNA zincirinin yer değiştirilmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan yeni DNA zinciri reaksiyonun kalanında hedef bölge olarak kullanılarak çoğalması sağlanmaktadır. SDA ilk kullanılmaya başlandığında ısı denatürasyonu gerektiren bir yöntem iken daha sonraki dönemlerde modifiye edilerek bu aşama elimine edilmiştir. RCA yönteminde izotermal koşullarda yuvarlak DNA probuna bağlanan primerin devamlı olarak  $\Phi$  29 DNA polimeraz yardımı ile çoğaltılması esasına dayanır. IMDA ise, çoklu primerler kullanılarak nükleik asit dizilerinin zincir yer değiştirme yoluyla çoğaltılması temeline dayanan bir tekniktir. Helikaz tabanlı çoğalma (HDA), DNA helicaz enziminin çift sarmallı yapıları açabilme özelliğinde yararlanılarak geliştirilmiş bir yöntemdir. cHDA'da sirküler yapıdaki hedef DNA'lardan nükleik asitlerin çoğaltılmasında kullanılmaktadır. SPIA çoğaltma yönteminde ise kimerik yapıları tek bir primer kullanılarak DNA'nın (SPIA) veya RNA'nın (Ribo-SPIA) çoğaltılmasıdır (Gill ve Ghaemi 2008).

Yukarıda kısaca bahsedilen farklı izotermal çoğaltma yöntemlerinin kendi arasında avantajları veya PZR'de olduğu gibi bazı moleküler biyolojik alanlarda kullanımlarını kısıtlayan dezavantajları bulunmaktadır (Çizelge 3.C.1). Örneğin, SDA'da restriksiyon enzimlerinin ortamda bulunan diğer DNA'ları da kesebilmesi sonucu oluşan arka plan, pahalı olan modifiye nükleotidlerin kullanılması ve uzun hedef bölgelerin çoğaltılmasında yetersiz kalabilmesi bu tekniğin zayıf noktaları arasında sayılabilir. TMA'da izotermal koşullarda RNA'nın çoğaltılabilmesi için üç farklı enzimatik aşama (transkripsiyon/cDNA sentezi/RNA degradasyonu) gerekmekte ve reaksiyonda kullanılacak başlangıç materyali tek zincirli nükleik asit/RNA ile sınırlı olmaktadır. RCA tek ısıda yapılan çoğaltma teknikleri ile karşılaştırıldığında daha iyi ve basit oluşu ile ayrı bir yer tutmasına karşın kullanılan düşük ısılarla oluşabilecek muhtemel özgül olmayan çoğalmalar bu yöntemin tanısallık amaçlı olarak



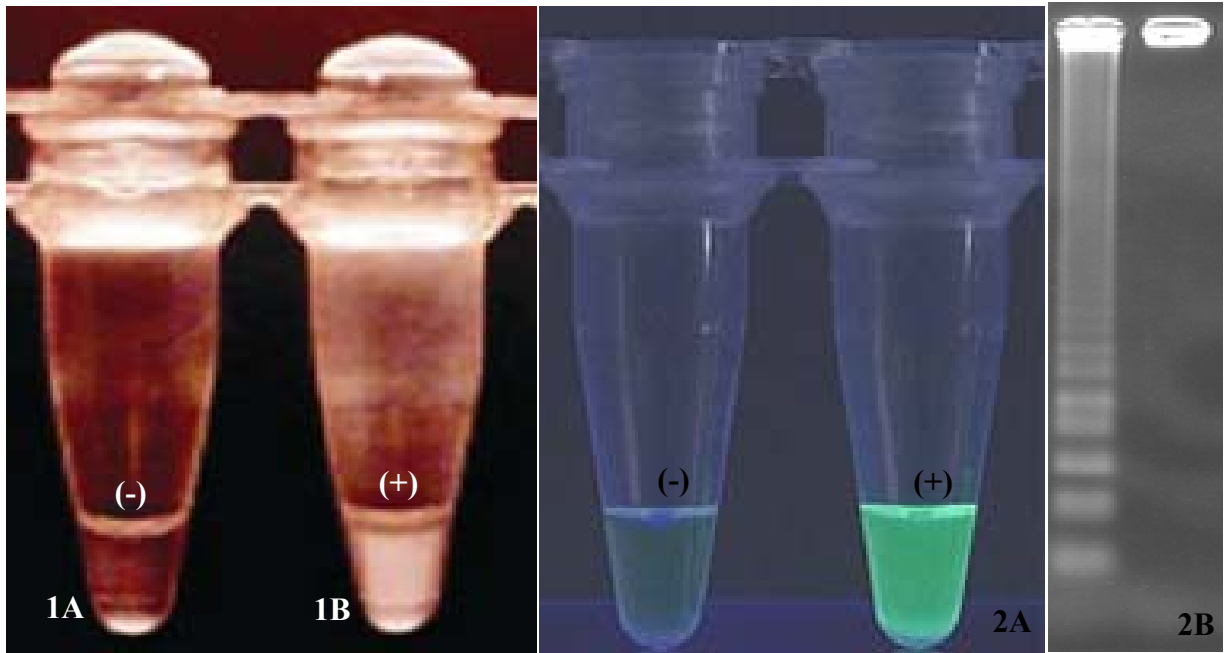
kullanımını kısıtlamaktadır. LAMP ve HDA dışındaki yöntemler reaksiyonda bulunabilecek muhtemel biyolojik bileşenlere karşı tolerans göstermemektedir (Kaneko ve ark 2007, Gill ve Ghaemi 2008). Bunun yanında tanısal amaçlı olarak kullanılan testlerin özellikle saha şartlarında kolay adapte olabilecek, yüksek özgüllük ve duyarlılıkta olmaları, ayrıca çoğaltılacak olan son ürünün rahat ve basit bir yöntem kullanılarak değerlendirilebilmesi önem taşımaktadır.

**Çizelge 3.C.1.** Bazı izothermal çoğaltma yöntemleri ile PZR' nin özellikleri (Gill ve Ghaemi, 2008)

Özellik	PZR	NASBA	SMART	SDA	RCA	LAMP	HDA	SPIA
DNA amplifikasyonu	+	+	+	+	+	+	+	+
RNA amplifikasyonu	+	+	+	+	+	+	+	+
Kullanılan ısılar °C	94, 55-60, 72	37-42	41	37	37	60-65	Oda ısısı*, 37, 60-65	45,50
Kullanılan enzim sayısı	1	2-3	2-3	2	1	1	2	3
Primer tasarlaması	basit	basit	kompleks	kompleks	basit	kompleks	basit	basit
Çoklu amplifikasyon	+	+	-	-	+	-	+	-
Ürünün belirlenmesi	Jel elektroforezi, ELISA, eş zamanlı	Jel elektroforezi, ELISA, eş zamanlı, ECL	ELISA, eş zamanlı	Jel elektroforezi, eş zamanlı	Jel elektroforezi, eş zamanlı	Jel elektroforezi, türbitide, eş zamanlı	Jel elektroforezi, ELISA, eş zamanlı	Bioanalizör
Biyolojik bileşenlere tolerans	-	-	-	-	-	+	+	-
Hedefin denetürasyonu	+	+	+	+	-	-	-	+
Dentürasyon faktörü	ısı	Rnase H	Rnase H	Restriksiyon enzimleri, bumper primerleri	Φ 29 DNA polimeraz	Betaine	Helicase	Rnase H

(\*); 22-24 °C, ELISA; enzime bağımlı immunosorbent assay, ELOSA; enzime bağımlı oligosorbent assay, ECL; elektrokemilüminosens

LAMP, izotermal koşullarda (63-65°C) thermal sikluslu makineye ihtiyaç duymadan, *Bst* DNA polimeraz enzimi yardımı ile az sayıdaki (bir kaç kopyaya kadarki) hedef DNA'yı kısa zamanda  $10^9$  kopyaya kadar çoğaltılabilen, yüksek özgüllüğe sahip [iki iç (FIP/BIP) ve iki dış (F3/B3) primer kullanılarak ] ve elde edilen ürünün kolay ve hızlı tespitine olanak veren bir yöntemdir (Notomi ve ark 2000, Gill ve Ghaemi 2008, Parida ve ark 2008). LAMP reaksiyonunda PZR'dan farklı olarak hedef DNA'nın 3' ucundaki F3c, F2c ve F1c ile 5' ucundaki B1, B2 ve B3 adlı altı farklı bölgeye özgü F3, FIP, B3 ve BIP olmak üzere dört tip primer kullanılmakta ve ısı denatürasyonuna gerek kalmadan (Nagamine ve ark 2001) hedef bölgenin çoğaltılmasına olanak sağlamaktadır. Buna ilave olarak çoğaltılan ürünler agaroz jel elektroforezi veya gözle görünür türbitide ve floresans özellikleri (Resim 3.C.1) ile hem laboratuvar koşullarında hemde saha şartlarında kolay ve etkin olarak belirlenebilmektedir (Parida ve ark., 2008; Tomita ve ark 2008, Mori ve ark 2001).



**Resim 3.C.1.** LAMP metodu ile çoğaltılan pozitif ve negatif DNA örneklerinin bulanıklık (türbitide), floresan ve agaroz gel elektroforezi yöntemleri ile belirlenmesi. (1); pozitif ve negatif örneklerde oluşan bulanıklığın çıplak gözle değerlendirilmesi. (1B); pozitif örnekte görülen tipik bulanıklık, (1A) negatif örnekte her hangi bir bulanıklık yok. (2); pozitif ve negatif örneklerin syber – green boyası eklendikten sonra UV ışık altında değerlendirilmesi. (2B); pozitif örnekte syber–green eklendikten UV ışık altında sonra oluşan yeşil renkli floresan, (2A); negatif örnekte syber–green eklendikten sonra renk oluşumu görülüyor. (3) pozitif ve negatif örneklerin agaroz gel elektroforez yöntemi ile değerlendirilmesi. (3); pozitif örnekte ethidyum bromid ile boyanmış agaroz gel elektroforezi sonucu UV ışık altında görülen tipik bantların görünürken, negatif örnekte ethidyum bromid ile boyanmış agaroz gel elektroforezi sonucu UV ışık altında her hangi bir bant görülmez.

LAMP yöntemi ile sığırlarda görülen *T. annulata*'nın (Salih ve ark 2008), koyunlarda görülen *Theileria* ve *Babesia* soyunda yer alan kan parazitlerinin (Guan ve ark 2008, Liu ve ark 2008), köpeklerde görülen *B. gibsoni*'nin (Ikadai ve ark 2004), bovine babesiosis'in (Iseki ve ark 2007), equine piroplasmosis'in (Alhassan ve ark 2007a,b), sivrisineklerde *Plasmodium* türlerinin (Aonuma ve ark 2008), *Giardia duodenalis*'in (Plutzer ve Karanis 2009) ve *Cryptosporidium* türlerinin (Bakheit ve ark 2008, Karanis ve ark 2007) teşhisi amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda LAMP reaksiyonunun duyarlılığının PZR ile karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlara bakıldığında değişken düzeylerde duyarlılıklar elde edilmiştir. Kimi çalışmalarda PZR'ye oranla LAMP'ın daha duyarlı olduğu bildirilmekte (Salih ve ark 2008, Guan ve ark 2008, Isaki ve ark 2007, Karanis ve ark 2007) iken yapılan bazı çalışmalarda eşit duyarlılıkta oldukları (Ikadai ve ark 2004, Alhassan ve ark 2007b) bildirilmiştir. Tropikal theileriosis'in etkeni olan *T. annulata*'nın LAMP yöntemi ile teşhisinde bugüne kadar sadece tek bir çalışma yapılmış ve bu çalışmada çoğaltılan hedef *SVSP* geni özgül ve PZR'ye oranda daha duyarlı olarak çoğaltılarak saha şartlarında kullanılabilecek bir test olduğu belirtilmiştir (Salih ve ark 2008).

Bu kısımda, PZR'ye oranla az zahmetli ve daha duyarlı olan, aynı zamanda saha şartlarında uygulanabilir olduğu düşünülen LAMP yöntemi ile Mero1, Tams-1 ve sitokrom b genlerine özgü primer çiftleri tasarlanarak *T. annulata*'nın hasta ve/veya taşıyıcı hayvanlarda tespitinde özgüllük ve duyarlılıkları yönünden karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Aynı zamanda en yüksek duyarlılığa sahip olan primer çiftleri kullanılarak bunların saha şartlarında toplanan örneklerde uygulanabilirliği araştırılmıştır.

### 3.4.1. Gereç ve Yöntem

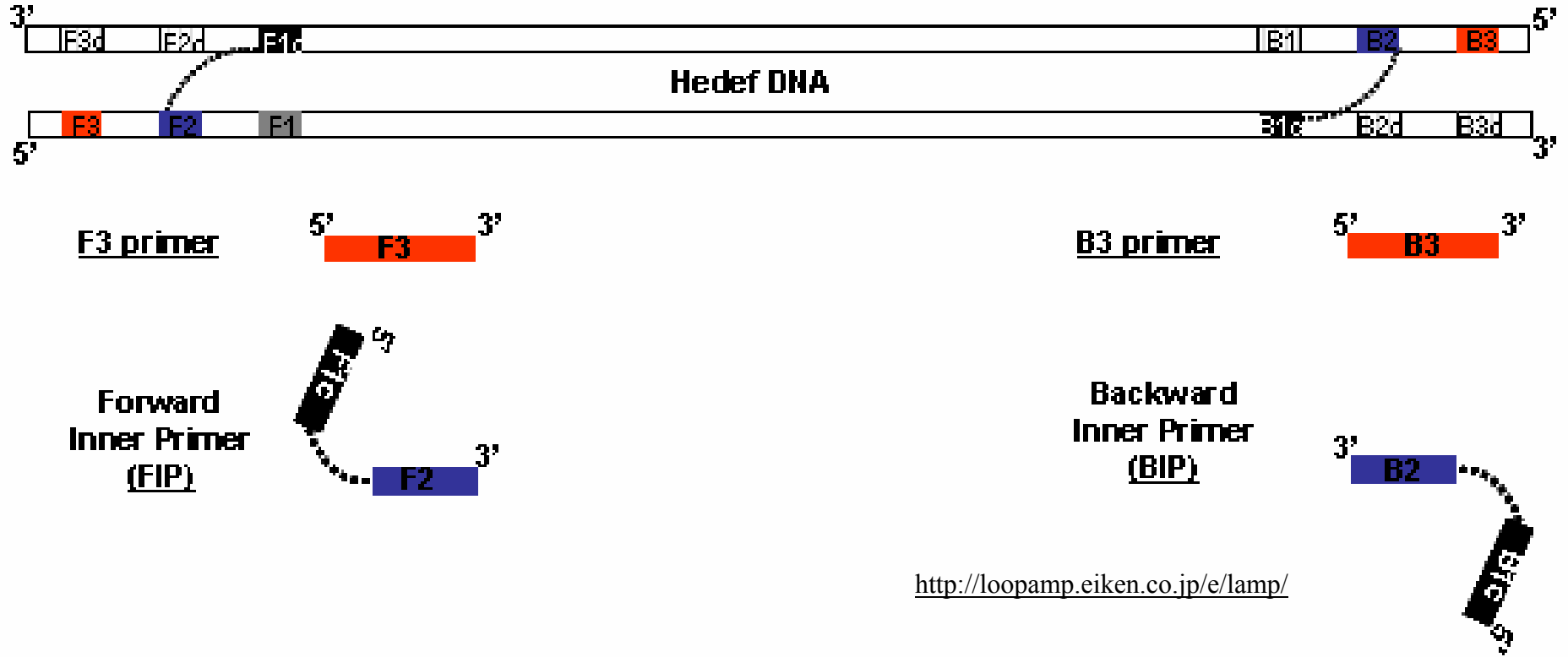
#### 3.4.1.1. Çalışmada Kullanılan Parazit Materyali

Bu çalışmada, *T. annulata*'nın 12 farklı izolatı (Ankara/D7, Tunus, İran, Sudan, Mısır, İsrayil, Hindistan, Akçaova, Dalama, Pendik, Aydın, Diyarbakır), *T. parva* Kenya, *T. sergenti*, *T. lestoquardi*, *B. bovis*, *B. bigemina* ve *T. equi* olmak üzere toplam 15 *Theileria* ve üç de *Babesia* soyuna bağlı parazite ait toplam 18 DNA örneği kullanılmıştır. Kullanılan parazit örneklerine ait detaylı bilgi Çizelge 3.A.1'de verilmiştir.

#### 3.4.1.2. LAMP Yönteminin Temel Çalışma Esası ve Kullanılan Primerlerin Özellikleri

DNA'nın Loop Aracılı İzotermal Yöntemle Çoğaltılması (LAMP); izotermal koşullarda (60-65°C), 5'→3' yönünde DNA' da zincir yer değiştirme aktivitesine sahip *Bst* DNA Polimeraz (geniş fragmenti) enzimi ve özel olarak tasarlanmış iki iç ve iki de dış primer kullanılarak gerçekleştirilen kendinden döngülü olarak DNA zincirinin yerine geçerek yapılan DNA çoğaltma yöntemidir. LAMP reaksiyonunda PZR'dan farklı olarak hedef DNA'nın 3' ucundaki F3c, F2c ve F1c ile 5' ucundaki B1, B2 ve B3 adlı altı farklı bölgeye özgü F3, FIP, B3 ve BIP olmak üzere dört tip primer kullanılmaktadır. Kullanılan primerler ve bunların hedef DNA üzerinde yerleşim bölgeleri Şekil 3.C.1'de gösterilmiştir. FIP (ileri yönlü iç primer); çoğaltılacak hedef DNA üzerindeki F2c bölgesine komplementer olan F2 kısmı ile 5' kısmındaki 'TTTT' veya istenilen nükleotidlerden oluşan ara bağlayıcılar ve çoğaltılan yeni zincirde oluşacak F1 bölgesine komplementer F1c kısımlarından oluşur. BIP (geri yönlü iç primeri)'de hedef DNA'dan çoğaltılan zincirdeki B1 kısmına komplementer olan B1c, ara bağlayıcılar ve B2 kısımlarından oluşur. Reaksiyonda kullanılan ileri ve geri yönlü dış primerler sırasıyla F3c bölgesine komplementer olan F3 ve B3c bölgesine komplementer B3 primerleridir. LAMP reaksiyonu sabit bir ısıda (Örnek olarak; 65°C), zincir yer değiştirmesi aktivitesine sahip *Bst* DNA Polimeraz (geniş fragmenti) enzimi kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

### Hedef DNA'nın LAMP metodu ile çoğaltılmasında kullanılan primer çiftlerinin şematik görünümü

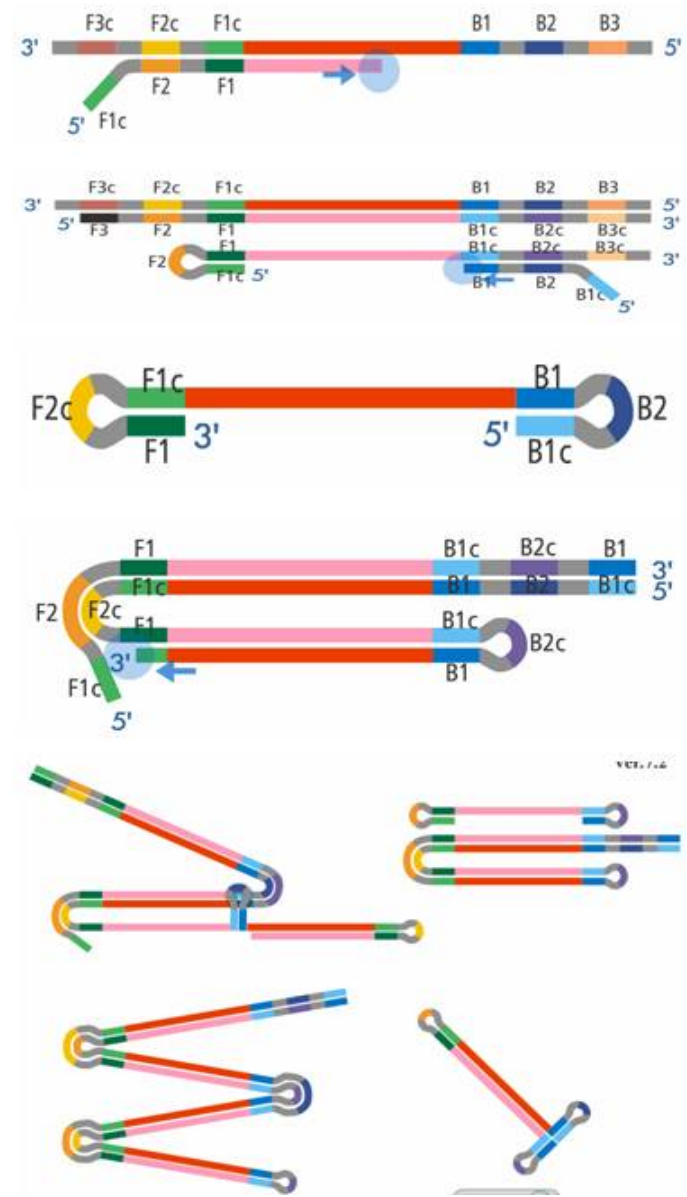
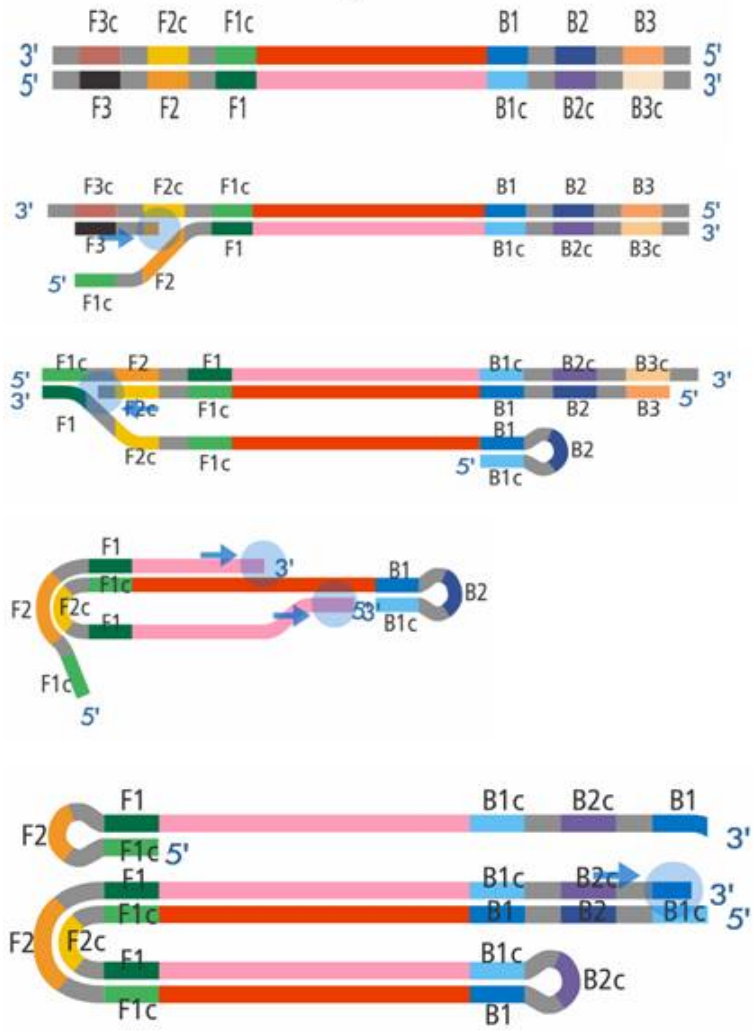


**Şekil 3.C.1.** LAMP metodu kullanılan primer çiftleri. (F3 ve B3) reaksiyonda kullanılan dış primer çiftleridir ve lineer yapılı sentetik oligonükleotidlerdir. (F3c ve B3c) sırasıyla F3 ve B3 primer çiftlerinin bağlandığı komplementer kısımlardır. (FIP) ileri yönlü iç primerdir, reaksiyon esnasında F3 kısmı ile hedef bölgeye bağlanıp çoğaltılan ve üründeki komplementer kısmı ile bağlanıp loop (döngü ya da ilmek) oluşturabilen F1c kısımlarından oluşur. (BIP) geri yönlü iç primerdir, reaksiyon esnasında B3 kısmı ile hedef bölgeye bağlanıp çoğaltılan ve üründeki komplementer kısmı ile bağlanıp loop (döngü ya da ilmek) oluşturabilen B1c kısımlarından oluşur. Bu şekil LAMP Primer designing software Primer Explorer (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/>) internet ana sayfasından değiştirilerek çizilmiştir.

Reaksiyonunun başlangıç aşamasında bahsedilen dört primerde kullanılırken, ilerleyen aşamalarda döngülü siklularda sadece iç primerleri zincir yer değiştirmesi yöntemiyle yapılan DNA sentezinde kullanılmaktadır. LAMP reaksiyonunun işleyişi ve öngörülen reaksiyon aşamaları Şekil 3.C.2’de gösterilmiştir. Reaksiyonun ilk aşamasında; ileri yönlü iç primer (FIP) çift zincirli hedef DNA üzerindeki F2c (komplementer bölge) kısmına bağlanarak zincir yer değiştirme aktivitesine sahip *Bst* DNA Polimeraz enzimi yardımıyla FIP’in 3’ yönünden başlayarak hedef DNA’ya komplementer olan zinciri sentezler (Şekil 3.C.2 [1 ve 2]). FIP’den birkaç baz daha kısa olan ve reaksiyondaki konsantrasyonu FIP’ den daha düşük olan F3 (dış primer) hedef DNA üzerindeki F3c (komplementer bölge) kısmına bağlanıp hedef DNA’yı kopyalar ve DNA tekrar çift zincirli yapı kazanır. Daha önce sentezlenen FIP’e bağlı olan komplementer kısım tek zincirli olarak serbest hale geçerek 5’ yönünde birbirlerine komplementer olan F1 ve F1c kısımlarında bağlanarak kadeh sapı şeklinde bir kavis oluşturur (stem-loop) (Şekil 3.C.2 [3, 4 ve 5]). İlk aşama sonunda oluşan tek zincirli yapı (Şekil 3.C.2 [5]) geri yönlü iç primer (BIP) aracılı DNA sentezi ve B3 primeri ile oluşacak olan zincir yer değiştirmesi ile meydana gelen halter şeklindeki (dumb-bell) yapı için hedef DNA’dır. Bunu takip eden ikinci aşamada; BIP oluşan yapıdaki B2c kısmına bağlanarak 3’ yönünden başlayıp hedef DNA’ ya komplementer olan zinciri sentezler ve bu esnada DNA’ nın kavisli yapısı eski yapısına dönerek tekrar düz bir hal alır. B3 primeri BIP’ nin ileri uç kısmındaki komplementeri olduğu B3c kısmına bağlanarak enzim yardımıyla 3’ yönünde başlayarak hedef DNA’yı kopyalar ve zincire çift sarmallı yapısını geri kazandırır. Önceden sentezlenen BIP’e bağlı olan komplementer kısım serbest hale geçerek 5’ ve 3’ kısımlarındaki birbirlerine komplementer olan sırasıyla F1–F1c ve B1–B1c kısımlarında bağlanarak kadeh sapı şeklinde bir kavis yaparak halteri andıran bir yapı oluşturur (Şekil 3. C.2 [6, 7 ve 8]). Oluşan halter benzeri yapı LAMP yönteminde çoğalma aşamasındaki başlangıç yapısıdır. İlk ve ikinci aşamalar LAMP siklusunda kullanılacak başlangıç materyelinin oluşması olarakta düşünülebilir. Üçüncü aşama (döngülü çoğaltma); halter benzeri DNA yapısı hızlı bir şekilde F1 kısmından 3’ yönünde DNA sentezin başlayarak kadeh sapı şeklindeki kavisli yapıya dönüşür. FIP kavisli yapıdaki komplementeri olan kısma (F2c) bağlanarak zincir yer değiştirmesi yoluyla DNA sentezini başlatır ve daha önceden sentezlenen DNA zincirini serbest hale geçirir. Serbest hale geçen zincirdeki 3’ kısmında birbirine komplementer olan B1c ve B1 kısımlarının bağlanmasıyla kavisli yapıyı oluşturup B1 kısmından 3’ yönünde kendinin bağlandığı DNA zincirine komplementer kısmı sentezleyerek FIP kısmına bağlı komplementer zinciri serbest hale geçirir (Şekil 3. C.2 [9]). Serbest hale geçen zincir her iki ucundaki birbirine komplementer olan F1–F1c ve B1–B1c

kisimlerinden bağlanarak halter şeklindeki yapıyı oluşturur (Şekil 3.C.2 [11]). Oluşan bu halter şeklindeki yapı Şekil 3.C.2 [8]’de oluşan LAMP’ın döngülü yapısıdır. Şekil 3.C.2 [11]’de oluşan bu halter şeklindeki yapının 3’ ucundaki B1 kısmından başlayarak kendinin bağlandığı DNA zincirine komplementer kısmı sentezler. Daha sonra BIP B2c kısmına bağlanarak zincir yer değiştirmesi yoluyla DNA’yı sentezler ve B1 kısmından başlayarak sentezlenen bir önceki yapıyı serbest hale geçirir. Bunun sonucunda reaksiyonda Şekil 3.C.2 [8, 9 ve 10]’dakine benzer yapılar oluşur. Şekil 3.C.2 [10]’daki yapı oluşuktan sonra BIP komplementer olan tek zincirli kısımdaki B2c’ ye bağlanır ve çift zincirli yapıdaki kısımları zincir yer değiştirmesi yoluyla sentezler. Bu aşamanın sonunda aynı zincir üzerinde farklı uzunluklarda, çoğaltılacak hedef bölgenin değişik şekillerde ters dönmüş tekrarlı yapılar oluşur.





Şekil 3.C.2. LAMP metodu ile hedef DNA'nın çoğaltılması (*Devam*),

**Şekil 3.C.2.** LAMP metodu ile hedef DNA'nın çoğaltılması. **(1)**; LAMP metodunun ilk aşamasında FIP primeri hedef DNA üzerindeki bağlanma yerine F2 (lineer yapılı bölge) bölgesi ile bağlanarak *Bst* DNA polimeraz enzimi aracılığı ile hedef DNA'yı bağlanma bölgesinden başlayarak komplementer olarak kopyalar. **(2)**; kopyalanan zincir daha sonra bağlanan F3 dış primeri yardımı ile, F2 bağlanma bölgesinin 5' yönüne yakın kısmından, aynı enzimi kullanarak hedef DNA'nın komplementeri olan ayrı bir zincir daha sentezleyerek bir önceki zinciri serbest hale geçirir. **(3 ve 4)**; bir önceki aşamada serbest hale geçen DNA zinciri üzerindeki FIP primerinin F1c kısmı sentezlenen zincir üzerindeki komplementer kısmına bağlanarak zincirin 5' kısmında loop yapısını oluşturur, aynı zamanda bu zincire 3' yönde komplementer kısmına BIP primerinin B2 kısmı ile bağlanarak bu zincirden ilgili enzimi kullanarak yeni bir komplementer yeni bir zincir sentezler. Sentezlenme esnasında loop yapısı bağlandığı bölgeden ayrılarak lineer yapı kazanır. **(5)**; bu aşama sonucunda oluşan yeni zincir 5' ve 3' yönünde loop yapısını oluşturur. Bu yeni zincirde 5' yönündeki loop yapısını F1c kısmına F1 ile bağlanarak, 3' yönündekini de B1 kısmına bağlanan B1c ile oluşturur, bu yapı aynı zamanda LAMP reaksiyonunun tipik başlangıç materyalidir. **(6)**; bu aşamada FIP primerinin F2 kısmı ile F2c bölgesine (loop yapısına) dıştan bağlanarak 3' yönünde yeni bir zincir sentezler, aynı zamanda LAMP reaksiyonunun tipik başlangıç materyalinin loop yapısını oluşturmak için bağlandığı F1 kısmından 3' yönünde başka bir zincir daha sentezler. **(7)**; bir önceki aşamada oluşan zincir ilave olarak LAMP reaksiyonunun tipik başlangıç materyalinin 3' ucunda loop yapısını oluşturan B1 kısmından 5' yönünde komplementer zincir sentezi gerçekleşir. **(8)**; bir önceki aşamada sentezlenen zincir LAMP reaksiyonunun tipik başlangıç materyali tekrar oluşturur, aynı zamanda 3' yönünden yeni zincirin sentezi dıştan devam ederek bir önceki basamaktaki yapıya komplementer olan inciri sentezler. **(9)**; bu ve sonraki aşamalarda daha önce sentezlenen ve mevcut zincirlerden yenilerinin sentezine devam edilerek LAMP reaksiyonunun tipik son ürünü olan yapı oluşur. Bu şekil LAMP Primer designing software Primer Explorer (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/>) internet ana sayfasından modifiye edilerek çizilmiştir. (Hakları, 2005, Eiken Chemical Co. Ltd.'ye aittir, Japonya)

LAMP yönteminde hedef DNA bölgesinin özgün olarak çoğaltılabilmesi için kullanılacak olan primer çiftlerinin doğru şekilde tasarlanması kritik öneme sahiptir. LAMP reaksiyonunda kullanılacak primerler geliştirilmiş ‘PrimerExplorer V3’ adlı bilgisayar programı (<http://primerexplorer.jp/e>) kullanılarak veya çıplak gözle tasarlanabilmektedir. Ancak primerlerin tasarlanmasında dikkat edilmesi gereken çok sayıda önemli nokta olmasından dolayı var olan bilgisayar programı primerlerin tasarlanması için en çok tercih edilen yöntemdir. Reaksiyonda kullanılacak primerler (F1P, B1P, F3 ve B3) tasarlanırken dikkat edilmesi gereken önemli noktalar ve bunlara ait optimum parametreler aşağıda anlatılmıştır,

- Primer bölgeleri arasındaki mesafe; F2 ile B2 primerlerinin uç kısımları (LAMP reaksiyonunda çoğaltılan bölge) arasındaki mesafe 40–60 baz ve F2 ile F3 arasındaki mesafe 0–60 baz olacak şekilde hesaplanmaktadır.
- Primer bölgelerinin  $T_m$  değerleri; Reaksiyonda kullanılan F1c ve B1c primer bölgeleri için 65°C (64–66°C), F2, B2, F3 ve B3 primer bölgeleri için 60°C (59–61°C) olacak şekilde hesaplanarak kullanılmaktadır.
- Primer uçlarının kararlılığı; Reaksiyon esnasında serbest enerjide meydana gelen değişim ( $\Delta G$ ), oluşan son ürün enerjisinden ( $G_B$ ) başlangıçta materyalinin enerjisinin ( $G_A$ ) çıkartılması ile hesaplanmaktadır [ $\Delta G = G_B - G_A$ ]. Hedef DNA ile primerler arasındaki bağlanma bir denge reaksiyonu şeklindedir ve bağlanma düşük serbest enerjilerde gerçekleşmektedir. Yani oluşan serbest enerji değişimi ( $\Delta G$ ) ne kadar düşük (negatif) olursa primerlerin komplementeri oldukları hedef DNA bölgelerine o ölçüde iyi bağlanırlar. Reaksiyonda kullanılan primerlerin 5’ ve 3’ uçları DNA sentezinin başlama noktası olduğu için bu kısımların belli bir ölçüde kararlılığa sahip olması gereklidir. Kullanılan F2/B2, F3/B3 primer bölgelerinin 3’ uçları ile F1c/B1c primerler bölgelerinin 5’ uçlarının serbest enerjileri  $\Delta G \leq -4$  kcal/mol olacak şekilde hesaplanmaktadır.
- GC oranları; Tasarlanan primerlerin GC oranları normal ve GC’den zengin gen bölgeleri için %50–60, AT’den zengin gen bölgeleri için %40–50 olacak şekilde hesaplanmaktadır.

- İkincil yapılar; Reaksiyonda kullanılan primerler, özellikle iç primer bölgelerinin 3' uçları AT'den zengin olmamalı ve diğer primerlerle komplementer yapı göstermemelidir.

### **3.4.1.3. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Tasarlanması ve Bunlara ait Nükleotid Dizilimleri**

*Theileria annulata*'nın LAMP yöntemi ile tespitinde kullanılmak üzere ilk ikisi tek kopyalı ve diğeride muhtemel çoklu kopyaya sahip olan sırasıyla merozoit yüzey antijen geni (Mero1), 30 kDa major merozoite yüzey antijen geni (Tams-1) ve sitokrom b geni olmak üzere toplamda üç farklı gen bölgesine özgü primerler tasarlanmıştır. Her gen bölgesi için üçer tane olmak kaydıyla toplamda dokuz primer çifti (F3/B3 ve FIP/BIP olmak kaydıyla) 'PrimerExplorer V3' adlı bilgisayar programı (<http://primerexplorer.jp/e>) kullanılmış ve her gen için oluşturulan primer çiftlerinden 5'/3' stabiliteleri en yüksek olanlar ile primer-dimer oluşturma oranları en düşük olanlardan üçer adet seçilmiştir. LAMP metodu ile *T. annulata* DNA'sını çoğaltmakta kullanılan primer çiftleri, bunların tasarlandığı gen bölgeleri ile dizilimleri Çizelge 3.C.2'de gösterilmiştir. Çoğalmadan sonra oluşan ürünlerin kesilebilmesi amacıyla tasarlanan her primerin FIP ve BIP çiftlerine Eco RI restriksiyon enzim bölgesi (GAATTC) konulmuştur.

**Çizelge 3.C.2.** LAMP metodu ile *T. annulata* DNA'sını çoğaltmakta kullanılan primer çiftleri ve bunların tasarlandığı gen bölgeleri

Gen adı	Tür adı	Primer adı	dizilim <sup>a</sup>	Kaynak
Merozoit yüzey antijen geni (Mero1)	<i>T. annulata</i>	<b>Mero21</b>	F3; TCTCTCTCTTGATATTGACAAAAG B3; AGACCTTCACATAGTGACG FIP; GCCCTCTTTCTTGAATGTGTATAACC <b>GAATTC</b> CAACTGCCACTGACAGAC BIP; TAATGTGAAACATGTTTACTTTCGGC <b>GAATTC</b> AAGTCACACCTCATATCATTGT	Bu tez
		<b>Mero 25</b>	F3; GATATTGACAAAAGATTCAACTGC B3; AGACCTTCACATAGTGACG FIP; GCCCTCTTTCTTGAATGTGTATAACC <b>GAATTC</b> CACTGACAGACTTGTGCTG BIP; TAATGTGAAACATGTTTACTTTCGGC <b>GAATTC</b> AAGTCACACCTCATATCATTGT	" "
		<b>Mero26</b>	F3; GATATTGACAAAAGATTCAACTGC B3; AGACCTTCACATAGTGACG FIP; GCCCTCTTTCTTGAATGTGTATAACC <b>GAATTC</b> CACTGACAGACTTGTGCTG BIP; TAATGTGAAACATGTTTACTTTCGGC <b>GAATTC</b> AAGTCACACCTCATATCATTGT	" "
30 kDa major merozoite yüzey antijen geni (Tams-1)	<i>T. annulata</i>	<b>Tams416</b>	F3; ACTGGAAAGATGTACACCTT B3; GTCCTTAAGCTCGAAGTAGG FIP; TTGGCATTGTTTGGTTTTCCGAC <b>GAATTC</b> CGGAATTTAAACCTTCCAAAGTCA BIP; TGTGGTTCTGATTCCAAGAAGT <b>GAATTC</b> TCAACCTTGAGTCACCG	Bu tez
		<b>Tams417</b>	F3; AACCTTCCAAAGTCACCTT B3; CCTGTGTCATTGAACCCA FIP; AGAACCAACAAAAACAACAACTTCA <b>GAATTC</b> CGACAAGAAAGAAGTCGGAA BIP; CCAAGAAGTTCGTCAAACCTACTA <b>GAATTC</b> CTTATCGTCCTTAAGCTCGA	" "
		<b>Tams898</b>	F3; ACTGGAAAGATGTACACCTT B3; GTCCTTAAGCTCGAAGTAGG FIP; TTGGCATTGTTTGGTTTTCCGAC <b>GAATTC</b> CGGAATTTAAACCTTCCAAAGTCA BIP; TGTGGTTCTGATTCCAAGAAGT <b>GAATTC</b> CTTCAACCTTGAGTCACCG	" "
Cytochrome b geni	<i>T. annulata</i>	<b>CYTOB1</b>	F3; ATGTGCCAGCAAAAGGTA B3; ACCAGAATACCAAGACCAA FIP; AGACGAACAAACCAACCGAAA <b>GAATTC</b> TGGCTTTTGAAAGTACTTTGG BIP; TCACTCGTTTGGAGTTTCGTTTTA <b>GAATTC</b> GGTAAATGATTACTAGAATACCACA	Bu tez
		<b>CYTOB341</b>	F3; CTGGAATATTGTTAGTACTCCA B3; CTAGAATACCACATACCTTTCATG FIP; CCAAAGTACTTTCAAAGCCATACC <b>GAATTC</b> TTATATCCGGGTGATGCT BIP; TGTTAAACATTTGTTTCGGTTGGTT <b>GAATTC</b> AAGAAGAAATAAAACGAAACTCC	" "
		<b>CYTOB288</b>	F3; CTTGGAATATTGTTAGTACTCCA B3; CTAGAATACCACATACCTTTCATG FIP; CGGCCAAAGTACTTTCAAAGCC <b>GAATTC</b> ATTATATCCGGGTGATGCT BIP; TGTTAAACATTTGTTTCGGTTGGTT <b>GAATTC</b> AAGAAGAAATAAAACGAAACTCC	" "

<sup>(a)</sup>; dizilimin 5'- 3' yönü verilmiştir. **Kalın**, gölgelenmiş, *italic* olarak yazılan '**GAATTC**' Eco RI restriksiyon enzimi ile kesim bölgelerini belirtmektedir.

#### 3.4.1.4. Tasarılan Primerlerin LAMP Yöntemi ile Değerlendirilmesi

LAMP reaksiyonunda kullanılmak üzere tasarlanan primerlerin özgüllükleri *T. annulata*'nın farklı izolatları (Tunus, İran, Umbanein, Gharb, İsrayil, Akçaova, Dalama, Pendik, Aydın, Diyarbakır), enfekte olmayan sığır periferal kan hücreleri, *T. parva*, *T. sergenti*, *T. lestoquardi*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *T. equi*, *A. marginale*, *A. centrale* ve *A. phagocytophila* türlerine ait DNA örnekleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla yapılan LAMP reaksiyonu 25 µl'lik son hacimde; 20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 8mM MgSO<sub>4</sub>, %0.1 Triton X-100, 0.8M Betaine (Sigma-Aldrich Inc., Amerika), herbir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'tan 1.4mM, 8U *Bst* DNA polimeraz (New England Biolabs Inc., İngiltere), 1.6µM ileri ve geri yönlü iç primerler (FIP/BIP), 0.2µM F3 ve B3 dış primerleri ile 1 µl DNA örneği kullanılmıştır. Reaksiyon Techne TC-512 marka otomatik termal sikluslu makinede 65°C'lik sabit ısıda 90 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir ve bunu takiben reaksiyon 80°C'de 4 dakika inkübe etmek suretiyle durdurulmuştur. Elde edilen LAMP ürünleri oda ısısı yada 4°C'de tutulmuştur. . Daha sonra her LAMP ürünleri ileriki kısımda anlatıldığı şekilde incelenmiştir.

Ayrıca, Hiroshi ve ark. (2007) tarafından *B. bovis*'in LAMP yöntemi ile teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan primer çiftleri (Çizelge 3.C.3) *B. bovis*'in Afrika (Kusanyangwa, Kuwangya), Meksiko (Meksiko, M07, Lismore), İsrayil (saha suşu I, II ve aşı suşu I,II), Aydın gibi farklı coğrafik bölgelere ait izolatlarının değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu bağlamda yapılan LAMP reaksiyonu 25 µl'lik son hacimde; 20mM Tris-HCl, 10mM KCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 8mM MgSO<sub>4</sub>, %0.1 Triton X-100, 0.8M Betaine (Sigma-Aldrich Inc., Amerika), herbir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'tan 1.4mM, 8U *Bst* DNA polimeraz (New England Biolabs Inc., İngiltere), 1.6 µM ileri ve geri yönlü iç primerler (FIP/BIP), 0.2µM F3 ve B3 dış primerleri ile 1 µl DNA örneği kullanılmıştır. Reaksiyon Techne TC-512 marka otomatik termal sikluslu makinede 63°C'lik sabit ısıda 90 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir ve bunu takiben reaksiyon 80°C'de 3 dakika inkübe etmek suretiyle durdurulmuştur. Elde edilen LAMP ürünleri oda ısısı ya da 4°C'de tutulmuştur. Daha sonra her LAMP ürünleri ileriki kısımda anlatıldığı şekilde incelenmiştir.

**Çizelge 3.C.3.** LAMP metodu ile *B. bovis* türlerine ait DNA'ları çoğaltmakta kullanılan primer çiftleri ve bunların tasarlandığı gen bölgeleri

---

<b>F3</b>	ACCAAAAACCTATCTGAAAGCCCAATG
<b>B3</b>	GGAGCCTCCCTGAAGAACT
<b>FIP</b>	AGGTTCTGGCTACATTCTCTTTCAGAATTCTGAGCCCACTAAAAAGTTTATGC
<b>BIP</b>	GCCAACCCACCAAGGAGTTTTTCAGAATTCTTGGTTGGTTGACCGATGTT

---

(Hiroshi ve ark 2007)

### 3.4.1.5. PZR ile LAMP Yönteminin Duyarlılığının Karşılaştırılması

LAMP yönteminin duyarlılığının belirlenmesi ve bunun F3/B3 primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR ile karşılaştırılması amacıyla deneysel enfekte buzağıdan elde edilen %0.1–10<sup>-10</sup> parazitemiye sahip 10 katlı sulandırmalar ile her sulandırmadan FTA kartları üzerine damlatılan örnekler ve D7 makroşizont hücre kültüründen hazırlanan DNA örneklerinden hazırlanan 10 katlı sulandırmalar kullanılmıştır. Ayrıca, hücre kültürlerinden hazırlanan DNA örnekleri ve saflaştırılarak elde edilmiş piropasmlardan hazırlanan DNA örneklerinde LAMP ve PZR' nin duyarlılıkları üzerine biyolojik bileşenler ile ortamda bulunan parazite ait başlangıç DNA miktarının etkilerinin belirlenmesi amacıyla eşit konsantrasyonlardaki *T. annulata* Ankara / D7 in vitro hücre kültürü ve *T. annulata* Ankara/C9 piroplazm DNA'larının ayrı ayrı 10 katlı olarak distile su ile sulandırılarak LAMP yöntemi ile yukarıda anlatılan koşullar altında değerlendirilmiştir. Buna ilave olarak, LAMP sonuçları, F3/B3 ve cytob1 primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR sonuçları ile karşılaştırılmıştır. PZR'u 50 µl'lik son hacimde, 45 mM Tris-HCl, pH 8.8, 11 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.113 mg/ml BSA, 4.4 µM EDTA, herbir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'tan 1 mM, 1 U Ampli Taq DNA polimeraz (Applied Biosystems), 10 µM ileri ve geri yönlü primer çifti ile 2 µl DNA örneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri 4°C'de tutulmuştur. Daha sonra her PZR ürününden 10 µl olmak koşuluyla mililitresinde 10 µl ethidiyum bromid bulunan %1,5'lik agaroz gelde 100 voltluk akımda bir saat elektroforeze tabi tutulmuş ve son olarak ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

### 3.4.1.6. LAMP Ürünlerinin İncelenmesi

LAMP reaksiyonu sonucunda çoğaltılan ürünler agaroz gel elektroforezi yada çıplak gözle incelenebilmektedir. Bu amaçla yapılan agaroz gel elektroforezinde her LAMP ürününden 10 µl olmak koşuluyla mililitresinde 10 µl ethidiyum bromid bulunan %1.5'lik agaroz gelde, 100 voltluk akımda bir saat elektroforeze tabi tutulmuş ve son olarak ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir. Bunun yanında LAMP reaksiyonunda, pyrofosfat iyonları DNA polimerizasyonu sırasında kullanılan deoksinükleotidtrifosfat' lardan son ürün olarak açığa çıkar [(DNA)<sub>n-1</sub>+dNTP→(DNA)<sub>n</sub>+P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>4-</sup>]. Oluşan pyrofosfat iyonlarının miktarı arttıkça LAMP reaksiyonunda kullanılan tampon solüsyonda bulunan magnezyum iyonları ile reaksiyona girerek magnezyum pyrofosfat [P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>4-</sup>+2Mg<sup>2+</sup>→Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>] şeklinde çökelti oluşmaktadır ve bu da çıplak gözle bakıldığında tüpte bulanıklık şeklinde görülmektedir (Mori ve ark 2001). Çıplak gözle incelemede kullanılan bir diğer yöntemde, reaksiyonda kullanılan tüpe 1 µl Syber Green I (İnvitrogen™) eklendiğinde pozitif olan tüplerde orijinal turuncu



renk yeşile dönüşmekte, negatif olan tüplerde ise herhangi bir renk değişikliği olmadan orijinal turuncu renk kendini muhafaza etmektedir. Bu amaçla, her tüpe 1 µl 1/10 oranında sulandırılmış Syber Green I (Invitrogen™) eklenerek pozitif örneklerdeki renk değişimi incelenmiştir.

#### **3.4.1.7. Oluşan LAMP Ürünlerinin EcoR I Restriksiyon Enzimi Kullanılarak Kesilmesi**

Çoğaltılan ürünlerde FIP ve BIP primerlerinin sırasıyla F2–F1c ve B2–B1c bölgeleri arasında bulunan boşlukta yer alan restriksiyon bölgesi (GAATTC) kesilerek oluşacak bantların incelenmesi amacıyla elde edilen ürünler pürifiye edilip Eco RI enzimi ile kesilmiştir. İlk olarak, LAMP ürünleri ortamda bulunan ve enzimin aktivitesini engelleyebilecek olan oligonükleotidler ile diğer materyallerden arındırılması amacıyla QIAquick PCR pürifikasyon kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen ürünlerin DNA konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra 1 µg DNA örneği 1 U Eco RI enzimi ile 37°C’de gece boyunca inkübe edilerek ilgili bölgelerinden (GAATTC) kesilmiş ve daha sonra enzimin inaktivasyonu için 65°C 20 dakika bekletilmiştir. Kesilen ürünler mililitresinde 10 µl ethidiyum bromid bulunan %2 agaroz jelde 100 voltluk akımda bir saat elektroforeze tabi tutulmuş ve son olarak ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

#### **3.4.1.8. F3/B3 Primer Çifti Kullanılarak Yapılan PZR Ürünlerinin Sekans Analizleri İçin Klonlanması**

LAMP yönteminde hedef DNA bölgesinin doğrulanması amacıyla reaksiyonda kullanılan F3/B3 primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR ile çoğaltılan bölge klonlanarak sekans analizine gönderilmiştir. Bu amaçla, *T. annulata*’nın C9 piroplasm ve D7 makroşizont DNA’ları F3/B3 primer çiftleri kullanılarak çoğaltılan PZR ürünleri %1,5’ lik agaroz gelde yukarıda belirtildiği şekilde elektroforeze tabi tutularak, ultraviyole ışık altında görüntülenmiş ve 185 bp’lık ürünler gelden kesilerek ayrılarak Qiagen gel purifikasyon kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılarak pürifiye edilmişlerdir. Daha sonra pürifiye edilen PZR ürünleri sekan analizi için TOPO TA Klonlama Kiti (Invitrogen™) kullanılarak pCR4-TOPO plasmid vektörü (Invitrogen™) içine klonlanmış (Bkz. 3.2.1.Gereç ve Yöntem/Seçilen Primer Çiftleri Kullanılarak Çoğaltılan PZR Ürünlerinin Sekans Analizleri İçin Klonlanması) ve pozitif koloniler seçilerek plasmid DNA’ları QIAGEN plasmid mini kiti kullanılarak pürifiye edildikten sonra 1 µg plasmid DNA EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz gelde elektroforeze tabi tutulmuş ve kesilen ürünlerin boylarına bakılarak PZR ürününün vektör

içerisine klonlanıp klonlanmadığı doğrulandıktan sonra plazmid DNA örnekleri (1–2 µg) 37°C’de bir gece boyunca kapakları açık olarak bekletilerek DNA’nın kuruması sağlanmış ve bu örnekler sekans analizlerinin yapılması için ticari bir şirkete gönderilmiştir (MWG Biotech, Almanya). Ayrıca, LAMP yöntemi ile F3/B3 dış primerlerinin çoğalttığı hedef DNA bölgesinin *T. annulata*’nın farklı izolatları (Ankara/D7, Dalama, D.bakır, A.ova, Aydın ve Pendik) arasında herhangi bir farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla belirtilen izolatlara ait DNA’lar F3/B3 primerleri kullanılarak yapılan PZR sonrası yukarıda anlatılan yöntemle klonlanarak sekans analizleri için gönderilmiştir.

#### **3.4.1.9. LAMP yönteminin Saha Şartlarında Denenmesi**

LAMP yönteminin saha şartlarında denenmesi amacıyla tropikal theileriosis’in endemik olarak görüldüğü bölgelerden toplanan toplam 52 kan örneğinden hazırlanan DNA örnekleri kullanılmış ve elde edilen sonuçlar cyto1 PZR ve multipleks PZR ile elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır.

□ Mero I, Tams1 ve sitokrom b genleri → PrimerExplorerV3 (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/>)

Gen adı	Tür adı	Primer adı	
Merozoit yüzey antijen geni (Mero – 1)	<i>T.annulata</i>	Mero21	• Primer-dimer • 5'/3' stabiliteeri
		Mero 25	
		Mero26	
30 kDa major merozoite yüzey antijen geni (Tams1)	" "	Tams416	
		Tams417	
		Tams898	Ürün elde edilememiş yada tüm izolatları özgül olarak çoğaltamamış
sitokrom b geni	" "	<b>CYTOB1</b>	
		CYTOB341	Tüm izolatlar (+)
		CYTOB288	

**CYTOB1** primerleri ✓

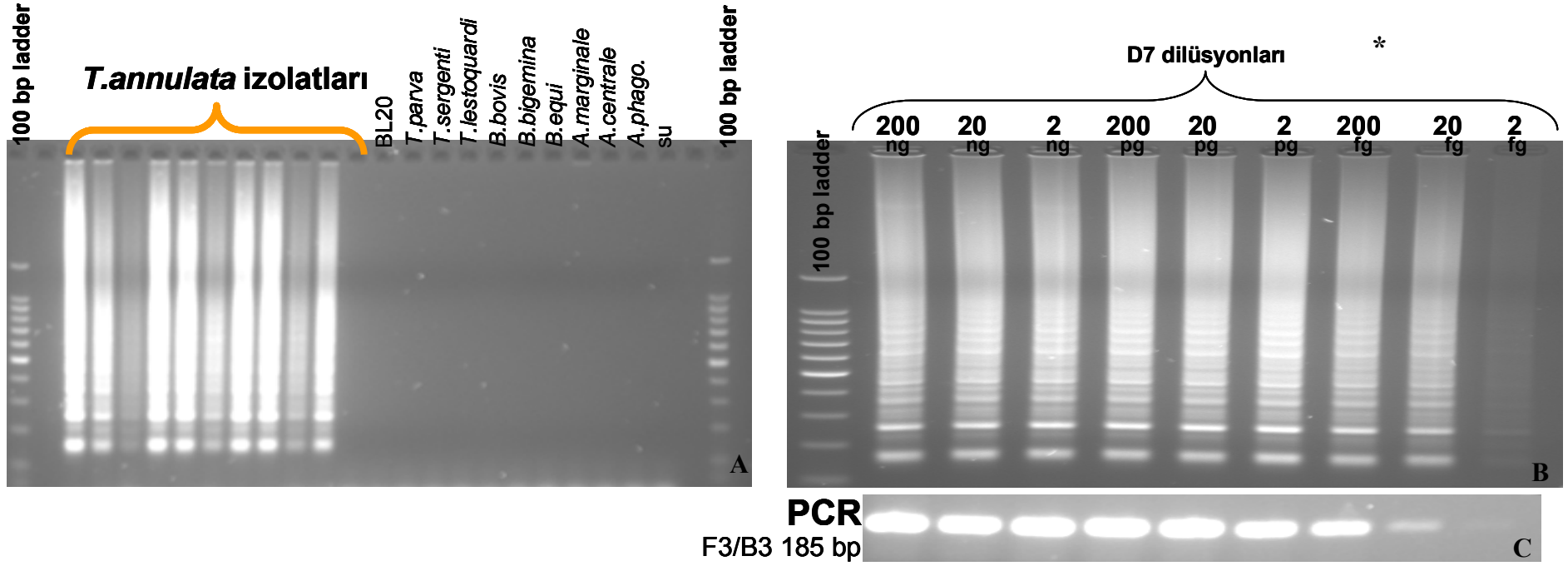
CYTOB341 duyarlılık ↓

Şekil 3.C.3. *Theileria annulata*'nın LAMP yöntemi ile teşhisinde tasarlanan primer çiftleri ve elde edilen sonuçlar

### 3.4.2. Bulgular

#### 3.4.2.1. Tasarlanan LAMP Primerleri ile Elde Edilen Sonuçlar

Şekil 3.C.3’de gösterilen ve *T. annulata*’nın LAMP yöntemi ile tespiti amacıyla merozoit yüzey antijen geni (Mero1), 30 kDa major merozoite yüzey antijen geni (Tams-1) ve sitokrom b genine özgül olarak tasarlanan toplam dokuz faklı primerlerin özgüllükleri faklı bölgelere ait izolatlar kullanılarak değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlara göre özgüllük ve duyarlılık yönünden en iyi sonuç veren primer çiftleri seçilmiştir. Bu doğrultuda yapılan denemelerde LAMP yöntemi ile Mero1, Tams-1 ve sitokrom b gen bölgelerini çoğaltmada kullanılan sırasıyla Mero21, 25, 26 ile Tams416, 417, 898 ve CYTOB241 pimer çiftleri tüm izolatları ve/veya hiçbir izolatı özgül olarak oğaltamamaları nedeniyle ileriki aşamalarda kullanılmamıştır. Bunun yanında sitokrom b genini çoğaltmada kullanılan diğer iki primer çifti olan CYTOB1 ile CYTOB341 ile *T. annulata*’nın faklı izolatlarına (Tunus, İnan, Umbanein, Gharb, İsrayil, Akçaova, Dalama, Pendik, Aydın, Diyarbakır) ait sitokrom b geni özgül olarak çoğaltırken, BL20, *T. parva*, *T. sergenti*, *T. lestoquardi*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *T. equi*, *A. marginale*, *A. centrale* ve *A. phagocytophila* türlerine ait DNA’larında herhangi bir çoğalma gözlenmemiştir (Resim 3.C.2 (A)).



**Resim 3.C.2.** (A); *T. annulata*'nın farklı izolatları ve diğer bazı *Theileira*, *Babesia* ve *Anaplasma* türlerine ait DNA'ları ile CYTOB1 primer çiftleri kullanarak yapılan LAMP reaksiyonu. Kuyu 1, 100 bp'lik moleküler boyut belirleyici (Invitrogen<sup>TM</sup>); kuyu 2, boş; kuyu 3, *T. annulata*'nın sırası ile Tunus, İran, Umbanein, Gharb, İsrayil, A.ova, Dalama, Pendik, Aydın, Diyarbakır izolataı; kuyu 4, boş; kuyu 5, enfekte olmayan sığır PBM; kuyu 6, *T. parva*; kuyu 7, *T. sergenti*; kuyu 8, *T. lestoquardi*; kuyu 9, *B. bovis*; kuyu 10, *B. bigemina*; kuyu 11, *T. equi*; kuyu 12, *A. marginale*; kuyu 13, *A. centrale*; kuyu 14 *A. phogocytophila*; kuyu 15, su; kuyu 16, boş; kuyu 17; 100 bp'lik moleküler boyut belirleyici (Invitrogen<sup>TM</sup>). (B ve C); *T. annulata*'ya ait cytochrome b genini çoğaltmakta kullanılan CYTOB1 primer çiftleri yapılan LAMP reaksiyonun (B) ve cyto b1 primer çifti kullanılarak yapılan PCR (C)'in sensitivitesinin *T. annulata*'ya ait DNA örneklerinin 10 katlı sulandırılmaları kullanılarak belirlenmesi. Kuyu 1, 100 bp'lik moleküler boyut belirleyici (Invitrogen<sup>TM</sup>); kuyu 2–11; *T. annulata* Ankara/D7 (A) ait her bir DNA örneğinin  $10^{-1}$ 'den  $10^{-10}$ 'a kadar olan 10 katlı sulandırılmaları. (\*); her sulandırma basamağındaki DNA miktarını gösterir.

### 3.4.2.2. PZR ve LAMP Yönteminin Duyarlılıklarının Karşılaştırılması

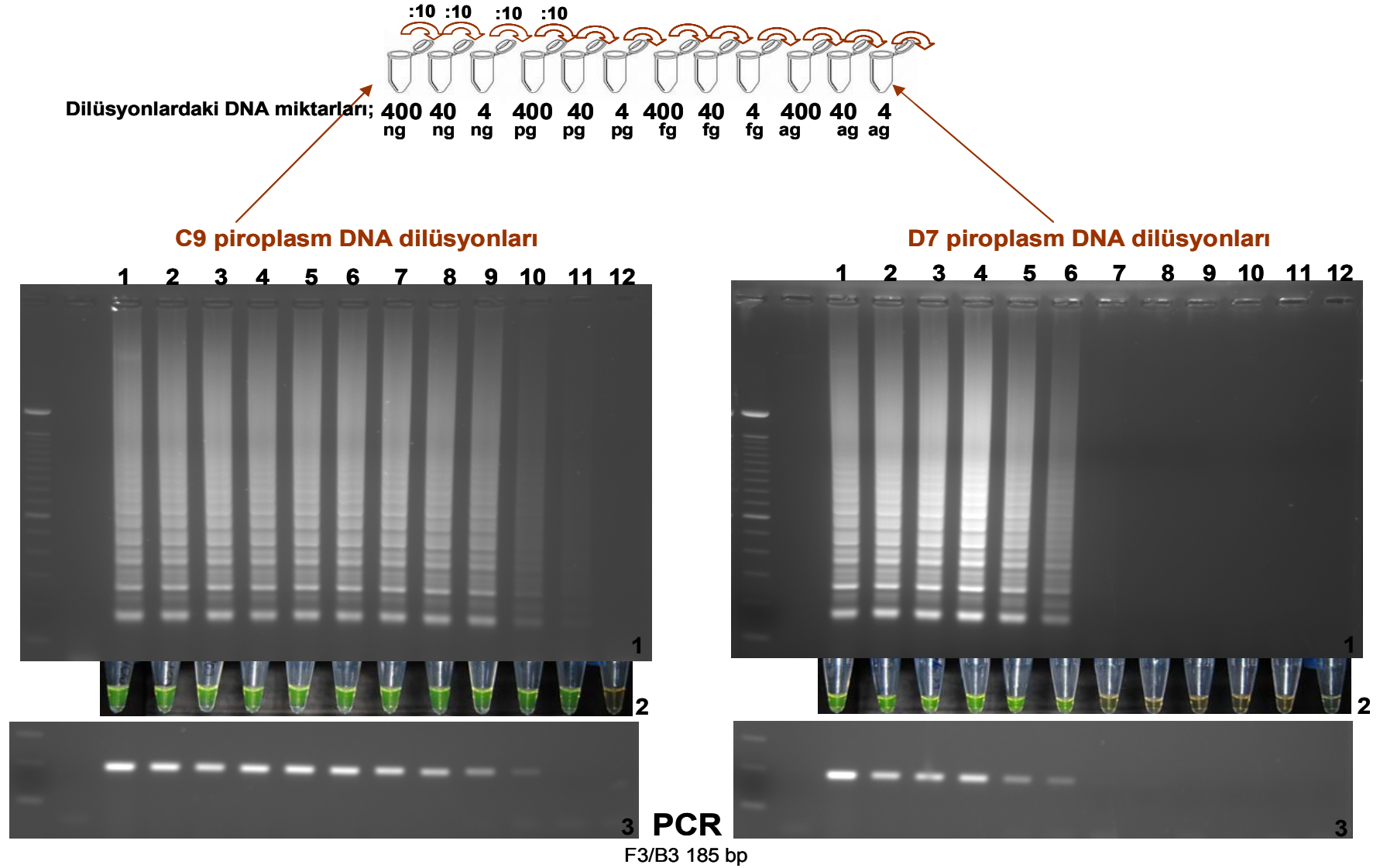
LAMP metodunun duyarlılığının belirlenmesi ve bunun F3/B3 primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR ile karşılaştırılması amacıyla deneysel enfekte buzağıdan elde edilen bilinen parazitemiye (%0.1–10<sup>-10</sup>) sahip 10 katlı sulandırmalar ile her sulandırmadan FTA kartları üzerine damlatılan örnekler ve D7 makroşizont hücre kültüründen hazırlanan DNA örneklerinden hazırlanan 10 katlı sulandırmalar kullanılarak yapılan değerlendirmede CYTOB1 primeri kullanılarak yapılan LAMP ve F3/B3 primerleri kullanılarak yapılan PZR deneysel enfekte buzağıdan elde edilen sulandırmalar ile D7 makroşizont hücre kültüründen hazırlanan sulandırmalarda testlerin sırasıyla 10<sup>-2</sup> ve 10<sup>-9</sup> olup her iki testinde eşit duyarlılığa sahip oldukları belirlenmiştir (Çizelge 3.C.4). D7 hücre kültürlerinden hazırlanan sulandırmalarda hem LAMP hemde PZR testi 2 femtogram (fg)'a kadar olan parazit DNA'sını çoğaltabilmiştir (Resim 3.C.2 (B ve C)). Bununla birlikte CYTOB341 primerleri ile yapılan LAMP deneysel enfekte buzağıdan hazırlanan dilüsyonlarda 10<sup>-2</sup> parazitemiye kadar duyarlılık gösterirken, D7 hücre kültüründen hazırlanan sulandırmalarda duyarlılığının 10<sup>-8</sup> olduğu belirlenmiştir. CYTOB341 primerleri ile yapılan LAMP D7 dilüsyonlarında 10 kat daha az duyarlılık göstermiştir. Bunun yanında FTA kartları kullanılarak yapılan denemede hiçbir ürün çoğaltılamamıştır. Sitokrom b genine ait 312 bp'lık bölgeyi çoğaltan cyto b1 primerleri kullanılarak yapılan PZR hem deneysel enfekte buzağıdan elde edilen hemde D7 makroşizont hücre kültüründen hazırlanan sulandırmalarda sırasıyla 10<sup>-4</sup> ve 10<sup>-10</sup> duyarlılıkla LAMP ve F3/B3 PZR'lerinde daha duyarlı olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.C.4).

Ayrıca, hücre kültürlerinden hazırlanan DNA örnekleri ve saflaştırılarak elde edilmiş piroplaslardan hazırlanan DNA örneklerinde LAMP ve PZR'nin duyarlılıkları üzerine biyolojik bileşenler ile ortamda bulunan parazite ait başlangıç DNA miktarının etkilerinin belirlenmesi amacıyla eşit konsantrasyonlardaki *T. annulata* Ankara/D7 in vitro hücre kültürü ve *T. annulata* Ankara/C9 piroplazm DNA'larının ayrı ayrı 10 katlı olarak deiyonize su ile sulandırılması ile hazırlanan örneklerde CYTOB1 primerleri ile yapılan LAMP yönteminde saflaştırılmış piroplazm DNA'ları D7 hücre kültüründen hazırlanan DNA dilüsyonlarına oranla 10<sup>5</sup> kez daha duyarlı olarak tespit edebilmiştir. Aynı dilüsyonlar ile F3/B3 primer çifti kullanılarak yapılan PZR'nde da LAMP ile elde edilen sonuçlarla paralellik göstermiştir (Resim 3.C.3).

**Çizelge 3.C.4.** PCR ve LAMP metodunun özgüllük ve duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması

10 katlı dilüsyonlar	PCR			LAMP	Bovis LAMP*
	cytob1	CYTOB1 F3/B3	CYTOB1	CYTOB341	
Deneysel enf. dilüsyonları**	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	
FTA kartları üzerindeki deneysel enf. dilüsyonu**	-	-	-	-	
D7 dilüsyonları	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-8</sup>	
<i>T. a.</i> suşları ve özgüllükleri	+	+	+	zayıf	
<i>B. bovis</i> suşu T dilüsyonları	-	-	-	-	özgün değil

\*, sadece *B. bovis* M07, Lismore ve Kuvanyga suşlarını çoğaltmıştır.



**Resim 3.C.3.** *Theileria annulata*'ya ait C9 piroplasm (A) ve D7 makroşizont kültürlerinden (B) hazırlanan DNA'ların 10 katlı dilüsyonlarında ( $10^{-1}$ - $10^{-10}$ ) sitokrom b genini LAMP yöntemi ile çoğaltmakta kullanılan CYTOB1 primer çiftleri (1) ve PZR yöntemi ile çoğaltmada kullanılan F3/B3 primer çiftleri (3) ile elde edilen duyarlılıklarının karşılaştırılması. (2); LAMP yöntemi ile çoğaltılan ürünlerin syber green (Invitrogen™) ile görüntülenmesi (Devam),



**Resim 3.C.3.** *Theileria annulata*'ya ait C9 piroplasm (A) ve D7 makroşizont kültürlerden (B) hazırlanan DNA'ların 10 katlı dilüsyonlarında ( $10^{-1}$ - $10^{-10}$ ) sitokrom b genini LAMP yöntemi ile çoğaltmakta kullanılan CYTOB1 primer çiftleri (1) ve PZR yöntemi ile çoğaltmada kullanılan F3/B3 primer çiftleri (3) ile elde edilen duyarlılıklarının karşılaştırılması. (2); LAMP yöntemi ile çoğaltılan ürünlerin syber green (Invitrogen<sup>TM</sup>) ile görüntülenmesi.

### 3.4.2.3. Sekans Analiz Sonuçları

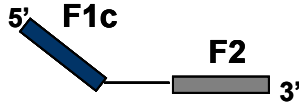
LAMP yönteminde çoğaltılan hedef DNA bölgesinin doğrulanması amacıyla *T. annulata*'nın C9 piroplasm ve D7 makroşizont DNA'ları reaksiyonda kullanılan F3/B3 primer çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltılan 185 bp'lık bölgenin sekans analiz clustal X bilgisayar programı kullanılarak yapılan karşılaştırma sonuçlarında piroplasm ve makroşizont dönemlerinde sitokrom b genine ait 185 bp'lık bölgede herhangi bir polimorfizm görülmemiş ve iki bölge birbirleri ile nükleotid seviyesinde %100 benzerlik göstermiştir (Şekil 3.C.4, B). NCBI veri tabanında kayıtlı gen bölgeleri ile yapılan karşılaştırma sonucunda 185 bp'lık dizilim analiz sonuçları ile veri tabanında kayıtlı sitokrom b genine ait aynı bölge arasında % 100 benzerlik gözlemiştir. LAMP yöntemi ile F3/B3 dış primerlerinin çoğalttığı hedef DNA bölgesinin *T. annulata*'nın farklı izolatları (Ankara/D7, Dalama, D.bakır, Akçaova, Aydın ve Pendik) arasında herhangi bir farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla yapılan sekans analiz sonuçları F3/B3 ve FIP ile BIP (B1c hariç) bölgelerinde herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 3.C.4 (A)). BIP primerine ait B1c bölgesinde SNP'ler gözlenmiş ve bu polimorfik nükleotidler primerin ilgili bölgeye bağlanmasında herhangi bir farklılığa yol açmamaktadır.

(A); *T.annulata*'nın farklı izolatlarına ait DNA'ların F3/B3 primerleri kullanılarak yapılan PZR'unun sekans sonucu

	F3	F2	F1	B1c	B2c	B3
genedb	ATGTGCCAGCAAAGGTA	TGGCTTTTGAAAGTACTTTGG	TTTCGGTTGGTTTGTTCGTCT	TCACCTCGTTTGGAGTTTC	TTTTA	xxTGTGGTATTCTAGTAATCATTACCTTGGTCTTGGTATTCTGGT
D7	ATGTGCCAGCAAAGGTA	TGGCTTTTGAAAGTACTTTGG	TTTCGGTTGGTTTGTTCGTCT	TCACCTCGTTTGGAGTTTC	TTTTA	xxTGTGGTATTCTAGTAATCATTACCTTGGTCTTGGTATTCTGGT
Dalama	ATGTGCCAGCAAAGGTA	TGGCTTTTGAAAGTACTTTGG	TTTCGGTTGGTTTGTTCGTCT	TCACCTCGTTTGGAGTTTC	TTTTA	xxTGTGGTATTCTAGTAATCATTACCTTGGTCTTGGTATTCTGGT
D.Bakır	ATGTGCCAGCAAAGGTA	TGGCTTTTGAAAGTACTTTGG	TTTCGGTTGGTTTGTTCGTCT	TCACCTCGTTTGGAGTTTC	TTTTA	xxTGTGGTATTCTAGTAATCATTACCTTGGTCTTGGTATTCTGGT
A.ova	ATGTGCCAGCAAAGGTA	TGGCTTTTGAAAGTACTTTGG	TTTCGGTTGGTTTGTTCGTCT	TCACCTCGTTTGGAGTTTC	TTTTA	xxTGTGGTATTCTAGTAATCATTACCTTGGTCTTGGTATTCTGGT
Aydın	ATGTGCCAGCAAAGGTA	TGGCTTTTGAAAGTACTTTGG	TTTCGGTTGGTTTGTTCGTCT	TCACCTCGTTTGGAGTTTC	TTTTA	xxTGTGGTATTCTAGTAATCATTACCTTGGTCTTGGTATTCTGGT
Pendik	ATGTGCCAGCAAAGGTA	TGGCTTTTGAAAGTACTTTGG	TTTCGGTTGGTTTGTTCGTCT	TCACCTCGTTTGGAGTTTC	TTTTA	xxTGTGGTATTCTAGTAATCATTACCTTGGTCTTGGTATTCTGGT

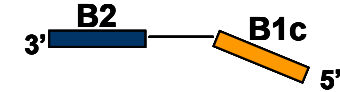
F3

FIP;



B3

BIP;



(B); C9 ve D7 DNA'larından F3/B3 primerleri kullanılarak yapılan PZR'unun sekans sonucu

	F3	F2	F1	B1c
C9	ATGTGCCAGCAAAGGTA	TGGCTTTTGAAAGTACTTTGGCCGTAATGTTAAACATTTGTTTCGGTTGGTTTGTTCGTCTTTATCACTCGTTTGGAGTTTCGTTTTA		
D7	ATGTGCCAGCAAAGGTA	TGGCTTTTGAAAGTACTTTGGCCGTAATGTTAAACATTTGTTTCGGTTGGTTTGTTCGTCTTTATCACTCGTTTGGAGTTTCGTTTTA		

	B2c	B3
C9	TTTCTTCTTTATGTTTCTACATATCATGAAAGGATGTTGGTATTCTAGTAATCATTACCTTGGTCTTGGTATTCTGGT	
D7	TTTCTTCTTTATGTTTCTACATATCATGAAAGGATGTTGGTATTCTAGTAATCATTACCTTGGTCTTGGTATTCTGGT	

Şekil 3.C.4. *Theileria annulata*'nın LAMP yönteminde kullanılan F3/B3 primer çiftleri ile yapılan PZR sonucunda elde edilen ürünleri dizilim analiz sonuçları. (A); *T. annulata*'nın farklı izolatlarına ait DNA'ların F3/B3 primerleri kullanılarak yapılan PZR'unun sekans sonucu. (B); C9 ve D7 DNA'larından F3/B3 primerleri kullanılarak yapılan PZR'unun sekans sonucu. F3 ve B3 dış primerlerin bağlanma bölgesi mavi renkte, FIP bağlanma bölgeleri F1 (altı çizili bölge) ile F2 (italik yazılı bölge), BIP bağlanma bölgeleri olan B1c (altı çizili bölge) ve B2c (italik bölge) şekilde ilgili bölgeler üst kısımda yazacak şekilde gösterilmiştir.

#### **3.4.2.4. Oluşan LAMP Ürünlerinin EcoR I Restriksiyon Enzimi Kullanılarak Kesilmesi**

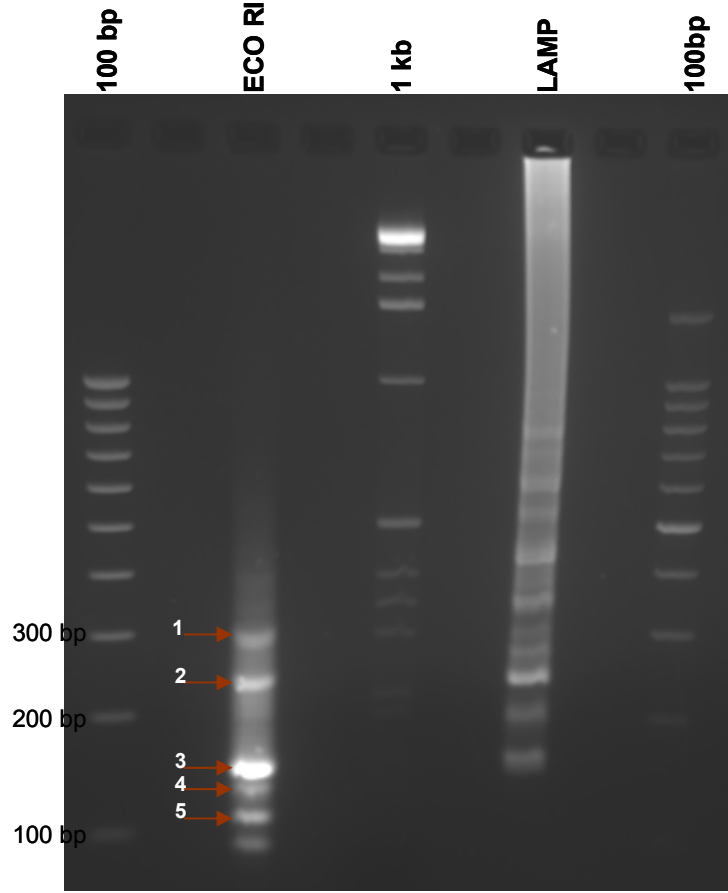
Çoğaltılan ürünlerde FIP ve BIP primerlerinin sırasıyla F2–F1c ve B2–B1c bölgeleri arasında bulunan boşlukta yer alan restriksiyon bölgesi (GAATTC) Eco RI enzimi ile kesilerek oluşan bantlar incelenmiş ve yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla 301 bp, 271 bp, 158 bp, 143 bp, 114 bp'lık toplam beş bant gözlenmiştir (Resim 3.C.4). Bunlarda 271, 185 ve 114 bp'lık bölgeler beklenen bantlar olmasına karşın, oluşan diğer iki bant (301 ve 143) daha önce yapılan analizlerde belirlenememiş bantlardır.

#### **3.4.2.5. *Babesia bovis*' in LAMP Yöntemi ile Teşhisinde Kullanılan Primerlerle Elde Edilen Sonuçlar**

Hiroshi ve ark (2007) tarafından *B. bovis*'in LAMP yöntemi ile teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan primer çiftleri (Çizelge 3.C.3) ile *B. bovis*'in Afrika (Kusanyangwa, Kuwangya), Meksiko (Meksiko, M07, Lismore), İsrayil (saha suşu I, II ve aşı suşu I,II), Aydın gibi farklı coğrafik bölgelere ait izolatları kullanılarak yapılan LAMP sonucunda sadece Kuwangya, M07 ve Lismore izolatlarında çoğalma gözlenirken kullanılan diğer izolatlarda herhangi bir ürün oluşmamıştır (Resim 3.C.5). Çizelge 3.C.3'de belirtilen primer çiftleri *B. bovis*'in farklı coğrafik bölgelere ait izolatlarının tümünü aynı özgülükte çoğaltamamıştır.

#### **3.4.2.6. LAMP yönteminin Saha Şartlarında Kullanılabilirliği**

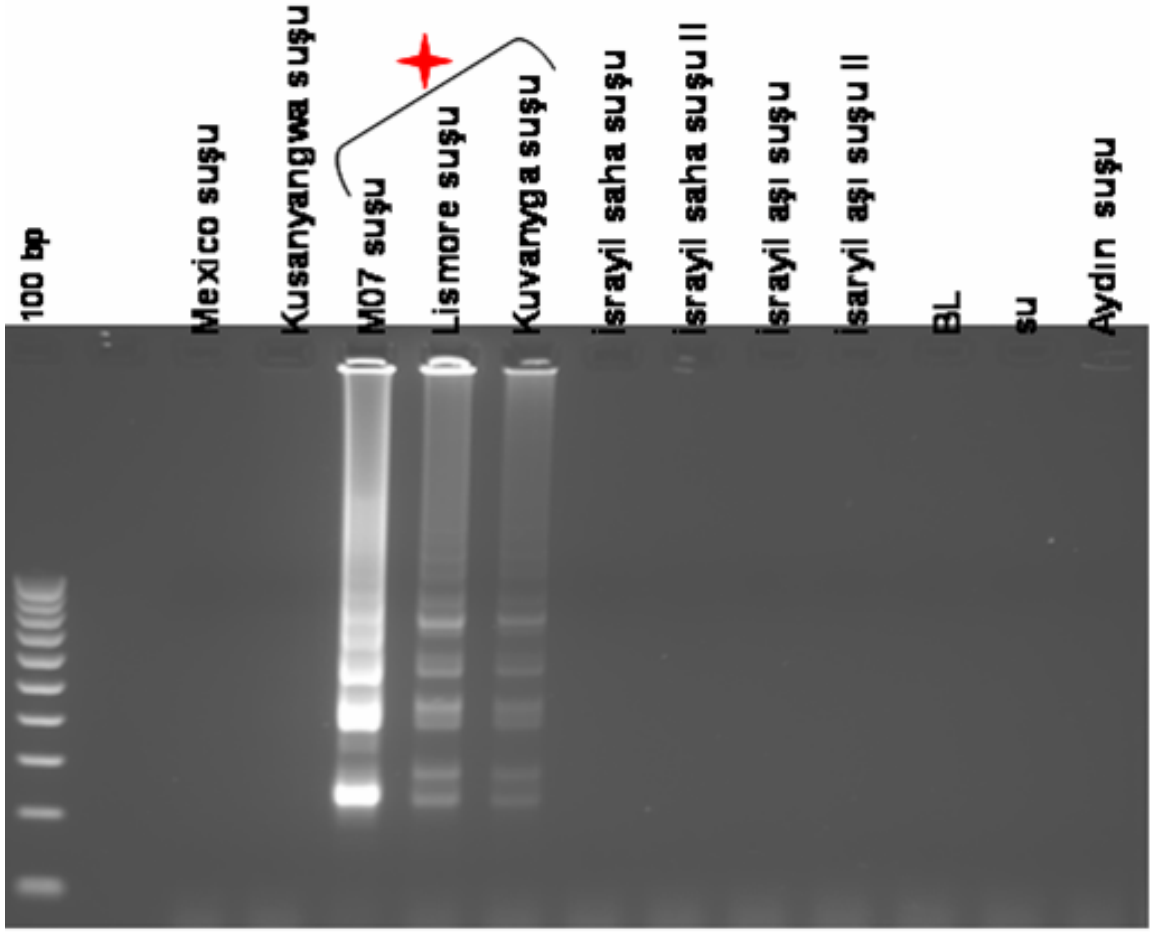
LAMP yönteminin saha şartlarında denemesi amacıyla tropikal theileriosis'in endemik olarak görüldüğü bölgelerden toplanan toplam 52 kan örneğinden hazırlanan DNA örneklerinin CYTOB1 LAMP, cyto b1 PZR ve multipleks PZR ile elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Cyto b1 PZR ve multipleks PZR' da toplanan 52 örnekte 51 tanesi *T. annulata* için pozitif sonuç verirken bir örnekte negatiflik bulunmuş iken, CYTOB1 primerleri kullanılarak yapılan LAMP testi sonucunda toplanan 52 örnekte sadece 28 tanesi pozitif, kalan diğer 24 örnekte ise negatif sonuç vermiştir (Çizelge 3.C.5). Buna ek olarak, LAMP testi sonrası yapılan agaroz jel elektroforezinde bazı örneklerin çok zayıf pozitiflik gösterdiği belirlenirken (Resim 3.C.6), tekli ve multipleks PZR testleri ile aynı örnekler daha güçlü pozitiflikler vermiştir.



✓ Eco RI restriksiyon (GAATTC) bölgeleri;

114 → 5  
143 → 4  
158 → 3  
271 → 2  
301 → 1

**Resim 3.C.4.** LAMP ürünlerinin Eco RI restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra yapılan %2 agaroz jel elektroforez görüntüsü. Ok işareti ile belirtilen bantlar sırasıyla 1; 301 bp, 2; 271 bp, 3; 158 bp, 4; 143 bp, 5; 114 bp LAMP ürünlerinin enzim ile kesildikten sonra oluşturduğu bantları göstermektedir.

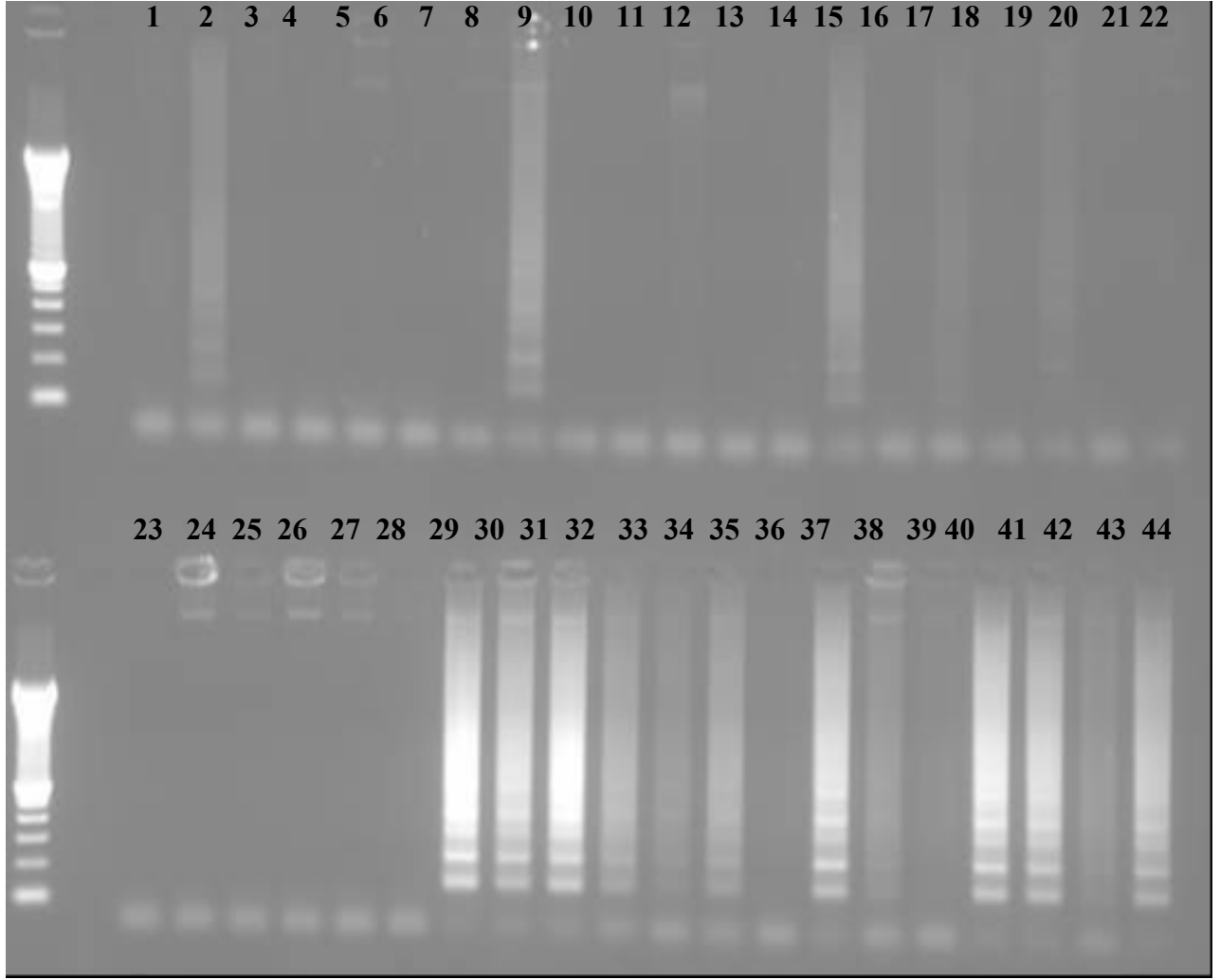


**Resim 3.C.5.** *Babesia bovis* türüne ait rhostry protein1 geninin Hiroshi ve ark., (2007) tarafından belirlenen primerler kullanılarak LAMP reaksiyonu ile çoğaltılması. Kuyu 1, 100 bp'lık moleküler boyut belirleyici (Invitrogen™); kuyu 2, boş; kuyu 3–11, *B. bovis*'in farklı suşları (Meksiko, Kusanyangwa, M07, Lismore, Kuvanyga, İsrayil saha suşu, İsrayil saha suşu II, İsrayil aşı suşu, İsrayil aşı suşu II); kuyu 12, enfekte olmayan sığır PBM; kuyu 13, su; kuyu 14; *B. bovis* Aydın suşu.

**Çizelge 3.C.5.** Sahadan toplanan DNA örneklerinin tekli ve multipleks PCR ile LAMP yöntemi kullanarak elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması

		<b>Sahadan Toplanan Kan Örnekleri</b>		
		<b>Pozitif</b>	<b>Negatif</b>	<b>Toplam sayı</b>
<b>Tekli PZR</b>				
	cytob1	51	1	52
	MAR1bB2	12	40	52
	bovar2A	4	48	52
<b>Multipleks PZR</b>				
	cytob1	51	1	52
	MAR1bB2	12	40	52
	bovar2A	4	48	52
<b>LAMP</b>				
	<b>CYTOB1**</b>	<b>28</b>	<b>24</b>	<b>52</b>

\*\*; bazı örneklerde çok zayıf pozitiflik görülmüştür.



**Resim 3.C.6.** *Theileria annulata* enfeksiyonunun endemik olarak görüldüğü bölgeden toplanan DNA örneklerinin CYTOB1 primer çiftleri kullanılarak LAMP reaksiyonu ile çoğaltılması. Kuyu 1 ve 23, 1000 bp'lık moleküler boyut belirleyici (Invitrogen™); kuyu 2, su; 3–22, 1 ile 22 arası toplanan örnekler (1 ve 22 dahil); kuyu 24, boş; kuyu 25–44, 23 ile 42 arası toplanan örnekler (23 ve 42 dahil).



### 3.4.3. Tartışma

Biyoteknoloji alanında yaşanan yenilikler nükleik asit çoğaltma teknikleri hastalık etkenlerinin belirlenmesinde rutin laboratuvar teknikleri ve modelleri haline getirmiştir (Gill ve Ghaemi 2008). PZR, NASBA, 3SR ve SDA gibi bir çok nükleik asit çoğaltma yöntemi mevcut olup bunlar arasında en geniş kullanım alanı bulanı RT-, nested ve multipleks gibi farklı çeşitleri olan PZR teknikleri olmuştur (Parida ve ark 2008). Rutin olarak kullanılan PZR tabanlı testlerde reaksiyonun oluşup hedef bölgenin çoğaltılmasında termal sikluslu makinelere ihtiyaç duyulması, zaman alıcı olması, PZR sonrasında oluşan ürünlerin analizinin gerekmesi gibi çoklu aşamalardan oluşmakta bu da muhtemel laboratuvar kontaminasyonlarına zemin hazırlayabilmektedir. Ayrıca, sayılan tüm bu dezavantajlar bu tekniğin saha şartlarına adapte edilip kullanılabilir olmasını kısıtlamakta ve sadece laboratuvar şartlarında sıklıkla kullanılan bir test haline getirmektedir. PZR ile floresans işaretli porbları bir arada kullanılarak eş zamanlı olarak hem hedef DNA bölgesinin çoğaltılması hemde problemlerin ilgili bölgelere hibridizasyonuna bağlı olarak oluşan ışımının belirlenerek örneklerin kantitatif tespitine olanak sağlayan eş zamanlı (real-time) PZR tekniklerinin geliştirilmesi normal PZR' ye göre oldukça avantaj sağlamıştır. Real-time PZR, konvensiyonel PZR'ye göre daha hızlı, kantitatif değerlendirmeye olanak veren, düşük kontaminasyon riski taşıyan, yüksek özgüllük ve duyarlılıkta, kolay standardize edilebilen bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte bu yönteminde kendi içinde, hassas cihazlara (termal sikluslu makine, bilgisayar, floresans ışımının ve emisyonun belirlenebilmesi için özel optikler gibi) ihtiyaç duyması, çoğaltılan ürünlerin tespitinin oldukça kompleks oluşu (analiz programları) ve oldukça pahalı bir test olması gibi dezavantajları vardır (Parida ve ark 2008). Özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki laboratuvarlarda rutin kullanım için oldukça masraflı bir yöntemdir.

Bunların dışında, son yıllarda termal siklusa ihtiyaç duymadan izotermal koşullar altında hedef bölgelerin çoğaltılmasına olanak sağlayan yeni teknikler (NASBA, 3SR ve SDA vb.) geliştirilmiştir (Gill ve Ghaemi 2008). Bu tekniklerinde kendi arasında bazı avantaj ve dezavantajları mevcuttur (Çizelge 3.C.1). Yeni nesil gen çoğaltma tekniklerinden biri olan LAMP, sabit ısıda (63-65°C), zincir yer değiştirebilme özelliğine sahip *Bst* DNA polimeraz enzimi yardımı ile hedef DNA'yı kısa zamanda  $10^9$  kopyaya kadar çoğaltılabilen, hedef bölge üzerindeki altı farklı bölgeye bağlanan özel olarak tasarlanmış iki iç (FIP/BIP) ve iki dış (F3/B3) primerden oluşan yüksek özgüllükte ve elde edilen ürünün kolay ve hızlı tespitine olanak veren bir yöntemdir (Notomi ve ark 2000, Gill ve Ghaemi 2008, Parida ve ark 2008).

Buna ilave olarak PZR ve real-time PZR ile karşılaştırıldığında daha yüksek ürün verimi ve sabit ısıda basit olarak yapılabilmesi ile yüksek oranda ürün oluşması ve çoğaltılan ürünlerin agaroz jel elektroforezi veya gözle görünür türbitide ve floresans özellikleri (Resim 3.C.1) ile hem laboratuvar koşullarında hemde saha şartlarında kolay ve etkin olarak belirlenebilen (Parida ve ark 2008, Tomita ve ark 2008, Mori ve ark 2001) LAMP diğer nükleik asit çoğaltma yöntemlerine göre daha avantajlı bir çoğaltma yöntemi olarak göze çarpmaktadır.

LAMP yöntemi son yıllarda, bazı genetik tabanlı çalışmalar (SNP'lerin belirlenmesi) ile viral, bakteriyel ve paraziter etkenlerin tanısal amaçlı belirlenmesinde giderek artan oranda kullanılmaya başlanmıştır. Paraziter kökenli hastalıklardan equine piroplasmosis, tropikal theileriosis, ECF ile bovine babesiosis etkenlerinin (Alhassan ve ark 2007a,b, Salih ve ark 2008, Thekiso ve ark 2009b, Iseki ve ark 2007) ve koyunlarda hastalık oluşturan *Theileria* ve *Babesia* soyundaki kan parazitlerinin (Guan ve ark 2008), *Giardia duodenalis* (Plutzer ve Karanis 2009) ve *Cryptosporidium* türlerinin (Bakheit ve ark., 2008; Karanis ve ark., 2007), *T. brucei* gambiense'nin (Kuboki ve ark 2003), köpeklerde *B. gibsoni* (Ikadai ve ark., 2004) ile ara konak sivrisineklerdeki *Plasmodium* spp.'lerin (Aonuma ve ark 2008) belirlenmesi amacıyla LAMP yönteminin kullanıldığı bazı çalışmalardır.

LAMP yönteminin başlangıç aşamalarında çoğaltılacak DNA üzerindeki altı farklı bölgeye özgü dört primer çifti ile geriye kalan aşamalarda ise iki primer çiftinin (DNA üzerindeki dört ayrı bölgeye özgü) kullanılması çoğaltılmak istenen hedef DNA özgülüğünü önemli ölçüde arttırmaktadır (Notomi ve ark 2000). Bu çalışmada da, *T. annulata*'nın hasta ve/veya taşıyıcı hayvanlarda LAMP yöntemi ile tespiti için Mero1, Tams-1 ve sitokrom b genlerine özgü primer çiftleri tasarlanmış ve özgüllükleri ile duyarlılıkları yönünden karşılaştırılmış ve sitokrom b genini çoğaltan CYTOB1 ile CYTOB341 primer çiftleri *T. annulata*'nın farklı izolatlarını (Tunus, İran, Umbanein, Gharb, İsrayil, Akçaova, Dalama, Pendik, Aydın, Diyarbakır) özgül olarak çoğaltırken, BL20, *T. parva*, *T. sergenti*, *T. lestoquardi*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *T. equi*, *A. marginale*, *A. centrale* ve *A. phagocytophila* türlerine ait DNA'larında herhangi bir çoğalma gözlenmemiştir. Benzer şekilde *T. annulata*'ya ait *SVSP* genini çoğaltan primerler (Salih ve ark 2008) ile *T. parva*'nın tek kopyalı PIM ve p150 gen bölgelerine özgü primerlerin farklı bölgelere ait izolatları özgül olarak çoğaltabildiği bildirilmiştir (Thekiso ve ark, 2009b). Bunun yanında, çalışmada kullanılan ve Mero1, Tams-1 ve sitokrom b gen bölgelerini çoğaltan sırasıyla Mero21, 25, 26, Tams417 ve CYTOB288 primer çiftlerinden herhangi bir ürün elde edilememesi, bunun yanında Tams416, 898 primer çiftleri tüm izolatları özgül olarak çoğaltamaması, *T. parva* için yapılan önceki çalışmalarda kullanılan p67 ile 18S primer çiftleri ile benzer sonuçlar (Thekiso ve ark 2009b)

elde edilmesi bize bu teste kullanılan primer çiftlerinin tasarlanmasında ve reaksiyonun optimizasyonunda dikkate alınması gereken birçok bilinmeyen değişken olduğunu ve bunların ileride yapılacak çalışmalar ile değerlendirilmesi gerektiği göstermektedir. HSP70 genine özgü tasarlanan primerler kullanılarak yapılan bir çalışmada PZR ve mikroskopik yöntemlere göre daha duyarlı sonuçlar alınmış ve bu gene özgü olarak tasarlanan primer çiftlerinin *T.annulata*/*T. parva*/*T. mutans* ve *T. taurotragi* etkenlerinin eş zamanlı tespitinde kullanılabilecek universal bir primer olduğu belirtilmiştir (Thekiso ve ark 2009b).

LAMP reaksiyonunda kullanılan solüsyonlara saklama koşullarının etkisi ile farklı ısılarda muhafaza edilen DNA örneklerinde reaksiyon solüsyonlarının etkinliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerde; LAMP yönteminin 25-37°C’de saklanan DNA örneklerinde trypanosoma DNA’larını çoğaltabildiği ve yine aynı şekilde farklı derecelerde (-20°C, 25°C ve 37°C) saklanan reaksiyon solüsyonların etkinliğinde istatistiksel olarak bir fark olmadığı belirlenmiştir (Thekiso ve ark 2009a). LAMP yönteminin kültür vasatına ve bazı biyolojik bileşenlere karşı tolerans gösterdiği yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Kaneko ve ark 2007). Ancak bu çalışmada, hücre kültürlerinden hazırlanan DNA örnekleri ile saflaştırılarak elde edilmiş piroplaslardan hazırlanan DNA örnekleri kullanılarak CYTOB1 primerleri ile yapılan LAMP’ın duyarlılığı üzerinde hücre kültürlerinden hazırlanan DNA’lar da *Bst* DNA polimerazın etkinliğine engel olan bazı inhibitörlerin ve/veya ortamda bulunan başlangıç hedef DNA miktarı (hücre kültürlerinden hazırlanan DNA parazit+konak hücre DNA’sının birarada oluşu) ile DNA izolasyon yöntemlerinin reaksiyonun verimliliği üzerine etkili olabileceği gözlenmiştir. Buna benzer şekilde, FTA kartları kullanılarak yapılan denemede LAMP ve PZR ile herhangi bir ürün elde edilememiştir. Yapılan çalışmalarda LAMP’ın etkinliğinin en iyi genomik DNA ile elde edildiği (%100), bunun yanında filtre kartları (%78), ham kan (%72) ve hemoliz edilmiş kan (%51) kullanılarak yapılan denemelerde LAMP’ın etkinliğinin ortamda bulunabilecek yüksek konsantaryondaki (1 mg/ml) EDTA ve Heparin gibi inhibitörlerin reaksiyonu olumsuz etkilediği ve testin verimliliğini azalttığı belirtilmiştir (Thekiso ve ark 2009a).

LAMP yönteminde çoğaltılmak istenilen organizmaların DNA’ları yüksek özgüllükte çoğaltılabilirken, kullanılan hedef DNA bölgesine, primer çiftlerine, reaksiyon koşullarına ve ortamda bulunan hedef DNA miktarına bağlı olarak LAMP metodunun duyarlılığının dış primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR ile elde edilen duyarlılıkları karşılaştırıldığında değişken olduğu görülmektedir. LAMP’ın, *T. brucei gambiense*’nin mikroskopik ve PZR metodlarıyla teşhisine (Kuboki ve ark 2003), aynı zamanda sığırlarda görülen tropikal theileriosis (Salih ve ark 2008) ve babesiosis (Iseki ve ark 2007) ile koyunlarda hastalık

oluşturan *Theileria* ve *Babesia* soyundaki kan parazitlerinin (Guan ve ark 2008) belirlenmesinde PZR'ye göre daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında, köpeklerde görülen *B. gibsoni*'nin (Ikadai ve ark 2004) ve equine piroplasmosis etkenlerinin tespitinde (Alhassan ve ark 2007b) kullanılan LAMP yöntemi ile PZR eşit duyarlılıkta hastalık etkenlerini tespit edebilmiştir. Bu çalışmada, CYTOB1 ve CYTOB341 primerleri ile yapılan LAMP reaksiyonuna ait duyarlılık aynı gen bölgesini PZR ile çoğaltan F3/B3 primer çifti ile elde edilen ile aynı bulunmuş, ancak aynı genin 312 bp'lık bölgesini PZR ile çoğaltan cytob1 primer çiftinden on kat az duyarlı olduğu belirlenmiştir. *T. annulata*'nın LAMP yöntemi ile tespitinde elde edilen bulgular doğrultusunda CYTOB1 primerleri 2 fg'a kadarki parazit DNA' sını tespit edebilmekte ve *SVSP* genini oranla (10 pg)  $10^4$  kez daha duyarlı olduğu görülmektedir. Ancak, Salih ve ark (2008) tarafından belirtilenin aksine LAMP PZR'ye oranla 10 kez daha duyarlı olmayıp eşit duyarlılık olduğu gözlenmiş ve saha şartlarında kullanılabilecek bir test olduğu belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada ise; *T. parva*'nın LAMP yöntemi ile tespitinde kullanılan tek kopyalı PIM ve p150 gen bölgelerine özgü primerlerin duyarlılığının 1 fg olduğu, P104 primer çiftlerinin ise PZR'ye oranla duyarlılığının daha düşük olduğu bildirilmiş ve saha şartlarında testin duyarlılığının değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Thekiso ve ark 2009b). Bu çalışmada saha şartlarından toplanan toplam 52 kan örneği ile yapılan değerlendirmede CYTOB1 primerleri kullanılarak yapılan LAMP testi ile PZR'ye oranda yaklaşık olarak %50 daha az pozitiflik gözlenmiştir.

Sonuç olarak, LAMP tekniği her ne kadar saha şartlarında kullanılabilecek ve yüksek özgüllükte bir test olmasına karşın bu kısımda sitokrom b genini çoğaltmada kullanılan CYTOB1 primerleri ile saha şartlarından toplanan örneklerde elde edilen bulgulara bakıldığında bu yöntemin *T. annulata*'nın tespitinde kullanılabilirliğinin PZR'ye oranla oldukça düşük olduğu bulunmuştur. Her ne kadar elde edilen sonuçlar bize testin düşük duyarlılığa sahip olduğunu göstermiş olsada LAMP'ın son yıllarda geliştirilmeye başlayan yeni bir nükleik asit çoğaltma yöntemi olması ve ileride yapılacak çalışmalarda kullanılabilecek farklı gen bölgeleri ve optimize edilecek koşullar ile duyarlılığının artırılarak saha şartlarına uygun bir yöntem haline gelebileceği göz ardı edilmemelidir.

## BÖLÜM 4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmanın ELISA ile serolojik teşhiste kullanılmak üzere proteinlerin belirlenmesi (Bölüm 2) başlıklı bölümünde; i) Biyoinformatik yöntemler kullanılarak *T. annulata*'nın makroşizont dönemine özgü proteinlerin belirlenerek klonlanıp üretimesi ve proteinlere karşı bağışık yanıtın deneysel enfekte hayvan serumları ile western blot metodu kullanılarak incelenmesi, ii) TaSP'ın immunodominant makroşizont antijeni olup olmadığının belirlenmesi ve immunodominant bantların tanımlanması, iii) Tropikal theileriosis hastalığının yaygın olarak görüldüğü bölgelerdeki hayvanlardan saha şartlarında toplanan sığır serumlarının indirek floresan antikor testi (IFAT) ve enzim işaretli immunosorbant testi (ELISA) ile karşılaştırılması olarak değerlendirilmesi, amaçlanmıştır. Bu kısımda ilgili amaçlar doğrultusunda elde edilen sonuçlar ve öneriler aşağıda sırasıyla anlatılmıştır.

Biyoinformatik/fonksiyonel analizler sonucu elde edilen bulgulara bakıldığında sinyal peptid (SP), membran bağlanma alanı (TMD), GPI bağlayıcı, EST verileri, dN/dS oranları gibi parametrelerin genomda yer alan muhtemel antijenlerin belirlenmesinde kullanılabileceği görülmüştür. Çalışmada kullanılan rekombinant proteinlerden TaSP (Schnittger ve ark 2002), Tams-1 (Glascodine ve ark 1990) ve Tams-2 (Dickson ve Shiels 1993)'ye karşı gelişen antikor yanıt her ne kadar biyoinformatik yolla belirlenen TA06510 proteini nazaran daha yüksek olsa da biyoinformatik yolla belirlenen bu protein immonojenik özellik göstermiştir. Sonuç olarak yapılan biyoinformatik analizlerin immonojenik özellik taşıyabilecek proteinlerin belirlenmesinde kullanılabilecek faydalı bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında her ne kadar antijenlerin belirlenmesinde kullanılan biyoinformatik yöntemler çok önemli avantajlar sağlasa da bunların deneysel çalışmalar olmadığı ve elde edilen verilerin mutlaka fonksiyonel olarak incelenmesi gerektiği unutulmamalıdır.

TaSP molekülünün immunodominant makroşizont antijeni olup olmadığının belirlenmesi ve immunodominant bantların tanımlanması amacıyla yapılan bloklama sonucunda TaSP molekülünün önceki çalışmalarda belirtilen immunodominant makroşizont antijeni (Schnittger ve ark 2002) olmadığı görülmüştür. Yapılan proteomiks analizlerinde elde edilen mass spektrofotometrik verilere bakıldığında sekans analizi için gönderilen protein bantta *T. annulata*/Ankara C9 genomunda bulunan TA15705 geni tarafından kodlanan hipotetik protein olduğu tespit edilmiştir *Theileria annulata* genomunda yapılan biyoinformatik incelemelerde muhtemel gen duplikasyonuna bağlı TA15705 geninin de içerisinde bulunduğu ve toplamda beş genden oluşan paralog gen ailesi bulunmuştur (Şekil

2.B.6). TA15705 geni tarafından kodlanan Ta9 ve TA15710 geni tarafından kodlanan Ta9.4 rekombinant proteinleri kullanılarak yapılan bloklama deneyleri sonucunda D7 hücre ekstraktlarında görülen  $\approx 44$  ve 46 kDa moleküler ağırlığa sahip iki bantı sırasıyla Ta9.4 ve Ta9 proteinleri olduğu belirlenmiştir.

Saha şartlarında enfeksiyonun belirlenmesinde, ELISA testleri arasında duyarlılığı en yüksek olan TaSP rekombinant proteini kullanılarak yapılan ELISA olduğu belirlenmiştir. Ancak sonuçlar incelendiğinde IFA testi ve diğer ELISA'ların (Ta9 ve Ta9.4) bir veya ikisiyle pozitif sonuç veren örneklerin TaSP ELISA ile negatif bulunması bize TaSP rekombinant antijenine karşı hayvanlarda gelişen humoral bağışık yanıtta farklılıklar olduğunu göstermiştir. Farklı coğrafik bölgelerde yer alan parazit popülasyonlarının gerek vektörel düzeyde görülen genetik rekombinasyon ve buna bağlı farklı genotiplerdeki transkripsiyonal değişimler gerek endemik stabil bölgelerde hayvanlar arasında görülen vektörel bulaşma oranının yüksek oluşu ve gerekse de farklı hayvanlar arasında parazite karşı gelişen bağışık yanıtın çeşitlilik göstermesinden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Ancak tüm bu değişkenlerin ayrı ayrı incelendikten sonra bir araya getirilerek son bir değerlendirme yapılması gerekliliği unutulmamalıdır. Parazite ait farklı yaşam dönemlerinde ortak olarak sentezlenen proteinlerin seviyeleri her yaşam döneminde aynı oranda olabildiği gibi farklı düzeylerde de sentezlenebilmekte, aynı zamanda Tams-1 ve TaSP moleküllerinde olduğu gibi bu proteinler parazitin farklı suşları hatta aynı izolata ait klonlar arasında rekombinasyonlara bağlı (Gubbels ve ark 2000, Schnittger ve ark, 2002) polimorfizm gösterebilmektedir. Bu doğrultuda saha şartlarında aşılı ve/veya doğal enfekte hayvanların ELISA gibi serolojik testlerle belirlenmesinde parazit kökenli proteinlerin ileride yapılacak daha kapsamlı çalışmalar ile tekrar değerlendirilmesi gerektiği görülmektedir.

Sonuç olarak; IFA testi, TaSP, Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenleri kullanılarak yapılan ELISA testlerine göre saha şartlarında enfekte hayvanlarda göre daha fazla sayıda pozitiflik belirlemiştir ( $p < .05$ ). Bununla birlikte *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* etkenlerinin hayvanlarda teşhisinde kullanılan IFA testinde türler arasında çapraz reaksiyonlar (Burrige ve ark 1974, Kiltz ve ark 1986, Kocan ve ark 2000, Molad ve ark 2006) göstermesi hastalıkların ayırıcı tanısında özgül sonuçlar elde edilmesini engellemektedir. Aynı zamanda vücutlarında paraziti taşıyan hayvanlarda antikor seviyeleri giderek azalmakta (Darghouth ve ark 1996) ve serolojik olarak negatif sonuç vermelerine karşın piroplazmaları kenelere nakledebilmeye devam etmektedir (Kırvar ve ark 2000). Serolojik testlerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak ve direk olarak etkene ait DNA'nın duyarlı ve özgül olarak tespiti için geliştirilen PZR, RLB (reverse line blot) ve Loop aracılı izotermal çoğaltma (LAMP; Loop-

mediated isothermal Amplification) gibi moleküler tanı yöntemleri son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çalışmanın tropikal theileriosis'in teşhisinde moleküler tanı yöntemlerinin kullanımı (Bölüm 3) başlıklı bölümde; i) *T. annulata* ile enfekte hasta ve taşıyıcı hayvanların duyarlı ve özgül olarak PZR yöntemi ile teşhisinde farklı gen bölgelerinin kullanılması, ii) Aydın yöresindeki sığırlarda sık olarak rastlanan ve hayvanlarda aynı anda hastalık oluşturan *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* türlerinin eş zamanlı teşhisinde kullanılmak üzere çoklu (multipleks) PZR testinin geliştirilmesi, iii) *T. annulata* DNA'sının Loop aracılı izotermal yöntemle çoğaltılması (LAMP) ve taşıyıcı hayvanların bu yöntemle teşhisi, amaçlanmıştır. Bu kısımda ilgili amaçlar doğrultusunda elde edilen sonuçlar ve öneriler aşağıda sırasıyla anlatılmıştır.

*Theileria annulata*'nın hasta ve taşıyıcı hayvanlarda PZR yöntemi ile daha duyarlı ve özgül olarak teşhisinde kullanılmak üzere yeni gen bölgelerinin çoğaltılması için *T. annulata* genomunda yer alan alternatif gen bölgeleri değerlendirilmiştir. Çoklu kopyaya sahip *Sfi*, *Tar* ve *SVSP* gibi gen ailelerini çoğaltmak için tasarlanan primer çiftleri gerek *Sfi* ve *Tar* gen ailelerinde yer alan paralog genler arasındaki nükleotid polimorfizmi gerekse *SVSP* ailesindeki paralog genler arasında görülen yüksek düzeyde heterojenite ve uzunluk farklılıkları sebebiyle hastalığın PZR ile tespitinde umut verici sonuçlar vermemiş ve çoklu kopyaya sahip genlerin yerine daha az polimorfik bölgelerin seçilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur (Ayrıntılı bilgi için bkz. 3.2.2. Bulgular). Bunun yanında muhtemel çoklu kopyaya sahip olacağı düşünülen mitokondriyal sitokrom b genini çoğaltmada kullanılan cyto b1 primer tropikal theileriosis ile enfekte taşıyıcı ve hasta hayvanlarda *T. annulata*'nın özgül ve duyarlı olarak teşhisini sağlamıştır. Cyto b1 PZR'nu *T. annulata*'nın teşhisinde 18S ssu rRNA geni çoğaltılarak yapılan PZR'na oranla 100 kez daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, *T. annulata* enfeksiyonuna taşıyıcılık yapan ve vücutlarında düşük seviyede parazitemiye sahip hayvanların belirlenmesinde cyto b1 primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR özgül ve duyarlı şekilde kullanılmıştır. *T. annulata*'nın patojen olmayan *Theileria* türleri ve hayvanlarda eş zamanlı hastalık oluşturabilen diğer kan parazitlerinden özgül olarak ayırımına olanak sağlamıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, sitokrom b geni kullanılarak geliştirilen PZR ile hastalığa taşıyıcılık yapan hayvanlar yüksek duyarlılıkla belirlenmiştir ve hastalığın görülmediği bölgelere endemik bölgelerdeki kontrolsüz hayvan hareketleri nedeniyle nakledilen hayvanların tespiti amacıyla özgül olarak kullanılabilceği belirlenmiştir.

Çalışmanın moleküler kısmında yer alan amaçlardan ikincisi olan *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* türlerinin eş zamanlı teşhisinde kullanılmak üzere çoklu (multipleks) PZR

yöntemi geliştirilmiştir. *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* enfeksiyonlarının endemik olarak görüldüğü Aydın ili ve buna bağlı ilçelerdeki hayvanlardan toplanan 73 kan örneğinde geliştirilen multipleks PZR yöntemi ile yapılan değerlendirmede dört örnekte *T. annulata*, *A. marginale* ve *B. bovis*, sekiz örnekte *T. annulata/A. marginale* ve dört örnekte *A. marginale/B. bovis* türleri ile enfekte oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca 73 hayvanın 39'unda *T. annulata*, 17'sinde *B. bovis* ve bir tanesinde *A. marginale* tek tür enfeksiyon olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen multipleks PZR yönteminin, sığırlarda önemli hastalık tablosu oluşturan *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* türlerinin yol açtığı ekonomik kayıpların azaltılmasında, hastalığın prevalansının belirlenerek yeni kontrol stratejileri oluşturulması amacıyla uygulanan epidemiyolojik çalışmalarda türlerin eş zamanlı ve özgül olarak tespitinde kullanılabilir basit ve etkili bir yöntem olduğunu gösterilmiştir (Ayrıntılı bilgi için bkz. 3.3.3. Tartışma).

*Theileria annulata*'nın hasta ve/veya taşıyıcı hayvanlarda LAMP yöntemi ile tespiti için Mero1, Tams-1 ve sitokrom b genlerine özgü primer çiftleri tasarlanmış ve özgüllükleri ile duyarlılıkları yönünden karşılaştırılmıştır. Sonuçta LAMP tekniği her ne kadar saha şartlarında kullanılabilir ve yüksek özgüllükte bir test olmasına karşın sitokrom b genini çoğaltmada kullanılan CYTOB1 primerleri ile saha şartlarından toplanan örneklerde elde edilen bulgulara bakıldığında bu yöntemin *T. annulata*'nın tespitinde kullanılabilirliğinin PZR'na oranla oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar bize testin duyarlılığının düşük olduğunu göstermiş olsada LAMP'ın son yıllarda geliştirilmeye başlayan yeni bir nükleik asit çoğaltma yöntemi olması ve kullanılabilir farklı gen bölgeleri ve optimize edilecek koşullar ile duyarlılığının artırılarak saha şartlarına uygun bir yöntem haline gelebileceği göz ardı edilmemelidir.



## ÖZET

Bu çalışmada sığırlarda *Theileria annulata* tarafından oluşturulan tropikal theileriosis hastalığının teşhisinde kullanılmak üzere yeni tanı metodları geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla geliştirilmek istenen tanı metodları, seroloji ve moleküler olmak üzere iki ana başlık altında toplanmıştır. Bunlar, i) ELISA yöntemiyle tropikal theileriosisin serolojik teşhisinde kullanılmak üzere rekombinant proteinlerin belirlenmesi, ii) tropikal theileriosis'in teşhisinde moleküler tanı yöntemlerinin (PZR, multiplex PZR ve LAMP) geliştirilmesi.

ELISA yöntemiyle tropikal theileriosisin serolojik teşhisinde kullanılmak üzere rekombinant proteinlerin belirlenmesi amacıyla öncelikle olarak biyoinformatik yöntemler kullanılarak *T. annulata*'nın makroşizont dönemine özgü proteinler saptanmıştır. Elde edilen proteinlere karşı deneysel enfekte hayvanlarda gelişen immün yanıt Western blot metodu kullanılarak incelenmiştir. İzleyen çalışmalarda, *Theileria annulata* yüzey antijeni olan TaSP'nin immunodominant bir makroşizont antijeni olup olmadığı incelenmiştir. Daha sonra, TaSP, immunopresipitasyon ile elde edilen Ta9 ve biyoinformatik yöntemler ile elde edilen TA06510 ve Ta9.4 rekombinant antijenler kullanılarak indirekt ELISA testlerinin geliştirilmesine çalışılmıştır.

Serolojik çalışmaların başında, Western blotlarda gözlenen immunodominant bantlarda polimorfizm olup olmadığı test edilmiştir. Bu amaçla, *T. annulata*'nın 16 farklı izolatu, *T. parva* Muguga ve *T. lestoquardi* Lahr'a ait makroşizont hücre kültürleri ve enfekte olmayan sığır lenfosarkoma (BL20) hücreleri parazit materyali ve protein ekstraktları olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, 40-42 kDa arasındaki bantlarda polimorfizm olduğunu göstermiştir.

*Theileria annulata*'nın makroşizont dönemine özgü proteinlerin biyoinformatik yöntemler kullanılarak belirlenmesinde *T. annulata* genomuna ait proteinlerin tamamı Signal P, GPI anchor, TMD ve PEST benzeri protein motiflerini içerip içermedikleri, EST verileri ve dN/dS oranları da dikkate alınarak incelenmiştir. Bu özelliklerine göre seçilen proteinleri kodlayan genler, klonlanarak rekombinant olarak üretilip Western blot ile değerlendirilmiştir. Bu yöntemle elde edilen TA06510 rekombinant proteinine karşı deneysel enfekte hayvanlarda antikor yanıt geliştiği tespit edilmiştir. Ancak bu proteine karşı elde edilen antikor yanıtının, daha önceki çalışmalarda immunojenik olduğu belirlenmiş Tams-1/2, TaSP gibi antijenlere karşı gelişen yanıtı göre daha zayıf olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, biyoinformatik yöntemlerin *T. annulata* genomuna kodlanan ve immunojenik özelliğe sahip olan proteinlerin saptanmasında kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak, biyoinformatik

yöntemlerle belirlenen proteinlerin immunojenik olup olmadıkları fonksiyonel analizlerle doğrulanmalıdır.

İmmun serumun TaSP rekombinant proteini ile bloklanması sonrasında yapılan Western blot analizleri sonucunda, daha önceki çalışmalarda immonodominant makroşizont antijeni olduğu öne sürülen TaSP molekülünün D7 protein ekstraktlarında görülen 42 kDa ağırlığa sahip immunodominant bant olmadığı tespit edilmiştir. Western Blot analizlerinde saptanan immunodominant bantların tanımlanabilmesi amacıyla immunopresipitasyon deneyleri ve proteomiks analizleri yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, D7 protein ekstraktlarında saptanan immunodominant bantlardan birisinin Ta9 proteini olduğunu göstermiştir. İzleyen çalışmalarda, D7 protein ekstraktlarında saptanan ikinci immunodominant bantın ise, Ta9 proteini ile aynı paralog ailede yer alan Ta9.4 proteini olduğu belirlenmiştir.

TaSP, Ta9, Ta9.4 ve TA06510 rekombinant antijenleri indirek ELISA testlerinin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Bilinen pozitif ve bilinen negatif serum örnekleri kullanılarak yapılan testlerde en iyi sensitivite (%89.5) ve spesifite (%98.3) TaSP rekombinant proteini ile elde edilmiştir. Sahadan toplanan serum örnekleri ile yapılan testler IFA testi ile, TaSP, Ta9 ve Ta9.4 rekombinant antijenleri kullanılarak yapılan ELISA testlerine göre daha fazla sayıda pozitiflik belirlenmiştir ( $p < .05$ ). Ancak, bu çalışmada geliştirilen indirek ELISA testlerinin sahada rutin olarak kullanılabilmesi için daha fazla sayıda bilinen pozitif ve negatif serum örnekleri kullanılarak yeniden standardize edilmesinde fayda görülmektedir.

Bu çalışmada tropikal theileriosis'in moleküler tanısında kullanılmak üzere PZR, multipleks PZR ve LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) yöntemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla yapılan moleküler analizlerde, *T. annulata*'nın 12 farklı izolatu, *T. parva* Kenya, *T. sergenti*, *T. lestoquardi*, *B. bovis*, *B. bigemina* ve *T. equi*'den elde edilen toplam 18 DNA örneği kullanılmıştır. PZR, multipleks PZR ve LAMP yöntemlerinde kullanılan primer çiftleri ilgili gen bölgelerine ait sekans bilgisine göre clustal X programı kullanılarak tasarlanmıştır. Moleküler testlerin duyarlılığının belirlenmesi amacıyla deneysel enfeksiyon oluşturulmuştur.

*Theileria annulata*'nın mitokondriyal sitokrom b genini çoğaltan cyto b1 primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR ile düşük seviyede parazitemiye sahip hayvanların duyarlı (bir  $\mu$ l kanda 0.1 piroplasm) ve özgün olarak tespiti yapılabilmektedir.

Bu çalışmada geliştirilen multipleks PZR yönteminin, sığırlarda önemli hastalık tablosu oluşturan *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* türlerinin eş zamanlı ve özgün olarak saptanmasında kullanılabilecek basit ve etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

Bu alışmada *Theileria annulata*'nın hasta ve/veya taşıyıcı hayvanlarda saptanması amacıyla, PZR ve multipleks PZR yöntemlerine ek olarak LAMP yöntemi de kullanılmıştır. LAMP yöntemi, termal siklusa ihtiyaç duymadan izotermal koşullar altında, kısa zamanda çok sayıda DNA'yı çoğaltılabilen, yüksek özgülükte ve elde edilen ürünün kolay ve hızlı tespitine olanak veren bir yöntemdir. Ancak CYTOB1 primerleri kullanılarak sahadan toplanan örnekler üzerinde yapılan LAMP çalışmalardan elde edilen sonuçlar *T. annulata*'nın hasta ve/veya taşıyıcı hayvanlarda saptanmasında bu testin PZR yöntemine göre daha az efektif olduğunu göstermektedir.

## SUMMARY

The aim of the present study is to develop new diagnostic methods for the detection of tropical theileriosis caused by *Theileria annulata* in cattle. Diagnostic approaches towards this end were based on serological and molecular methods. These were, i) Identification of recombinant proteins which can be of use in serological diagnosis of tropical theileriosis with ELISA, ii) Development of molecular diagnostic methods (PCR, multiplex PCR and LAMP) to use in the diagnosis of tropical theileriosis.

In order to identify recombinant proteins which can be of use in serological diagnosis of tropical theileriosis with ELISA, bioinformatic methods were used to determine proteins specific to the macroschizont stage of *T. annulata*. Immun response against these proteins were then evaluated in experimentally infected animals using Western blot analysis. Following studies were aimed to determine if the TaSP, a surface antigen of *Theileria annulata*, is the immunodominant macroschizont antigen. TaSP along with a recombinant protein generated through immunoprecipitation (Ta9) as well as recombinant proteins generated through bioinformatic methods TA06510 and Ta9.4, a paralog gene of Ta9, were used in later studies to develop indirect ELISA.

Immunodominant bands seen in Western blots were evaluated for the presence of any polymorphisms. To this end, 16 different isolates of *T. annulata* along with *T. parva* Muguga and *T. lestoquardi* Lahr makroschizonts as well as uninfected bovine leishmaniasis (BL20) cell lines were used as the parasite material and protein extract. Evidence gathered from these studies demonstrated that there exists polymorphism among bands within the range of 40-42 kDa.

In order to determine macroschizont stage-specific proteins of *T. annulata*, all proteins encoded by coding sequences in the *T. annulata* genome were bioinformatically screened for the presence of Signal P, GPI anchor, protein motifs such as TMD and PEST taking also the EST values and the dN/dS ratios into consideration. Genes encoding the selected proteins were then cloned, produced as recombinants and were evaluated in Western blots. It was determined that experimentally-infected animals developed an antibody response against the TA06510 recombinant protein. However, the antibody response against the TA06510 was determined to be less than the antibody response detected in previous studies against the Tams-1/2 and TaSP antigens known to be immunogenic. These results demonstrated that bioinformatic methods can be used to identify immunogenic proteins

encoded by the *T. annulata* genome. However, functional analyses should be performed in order to determine the immunogenicity of bioinformatically-identified proteins.

Western blot analyses carried out using immune sera blocked with TaSP recombinant protein revealed that a 42 kDa immunodominant band detected in D7 protein extracts is not the TaSP molecule that was suggested in previous studies as the immunodominant macroschizont antigen. Immunoprecipitation experiments and proteomics analyses were performed to characterize the immunodominant bands detected in Western blot analyses. Results obtained from these studies demonstrated that one of the immunodominant bands seen in D7 protein extracts is the Ta9 protein. Subsequent studies indicated that the other immunodominant band seen in D7 protein extracts is the Ta9.4 protein belonging to the same paralog protein family with the Ta9 protein.

TaSP, Ta9, Ta9.4 and TA06510 recombinant proteins were used to develop indirect ELISA tests. In tests performed with known- negative and positive serum samples, the best sensitivity (89.5%) and specificity (98.3%) was obtained with the TaSP recombinant protein. Tests performed using field serum samples indicated that a higher number of positivity was determined with the IFA test compared to those determined with the ELISA tests using the TaSP, Ta9 and Ta9.4 recombinant proteins ( $p < .05$ ). However, ELISA tests developed in the present study should be re-standardized using a higher number of known negative and positive serum samples for their routine use in the field.

PCR, multiplex PCR and LAMP methods were developed in the present study for molecular diagnosis of tropical theileriosis. In molecular analyses performed to this end, DNA samples obtained from twelve different isolates of *T. annulata*, *T. parva* Kenya, *T. sergenti*, *T. lestoquardi*, *B. bovis*, *B. bigemina* ve *T. equi*, 18 DNA samples in total, were used. Primer pairs used for the PCR, multiplex PCR and LAMP were selected based on the sequence information of relevant genes using the Clustal X program. Experimental infection was carried out in order to determine the specificity of the molecular tests.

Animals with a low level of parasitemia could be identified sensitively (0.1 piroplasms in 1  $\mu$ l blood) and specifically through PCR performed using cyto b1 primer pairs amplifying the mitochondrial cytochrome b gene of *T. annulata*.

Multiplex PCR method developed in the present study was demonstrated to be a simple and an efficient method in simultaneous and sensitive identification of *T. annulata*, *B. bovis* ve *A. marginale* species, all causing significant diseases in the cattle.

In addition to PCR and multiplex PCR, a LAMP method was also used in the present study to identify *Theileria annulata* in sick and/or carrier animals. The LAMP is a relatively easy method that enables quick amplification of numerous DNA fragments with high specificity in isothermal conditions with no need for a thermal cycler. However, results obtained from LAMP studies performed using CYTOB1 primers on samples collected from the field indicate that LAMP is less effective than the PCR in diagnosing *T. annulata* in sick and/or carrier animals.

## KAYNAKLAR

**Adamson R, Hall FR** (1996) *Matrix metalloproteinases mediate the metastatic phenotype of Theileria annulata-transformed cells*. Parasitology, 113 (Pt 5): 449-455.

**Adamson R, Hall R** (1997) *A role for matrix metalloproteinases in the pathology and attenuation of Theileria annulata infections*. Parasitology Today, 13: 390-393.

**Adamson R, Logan M, Kinnaird J, Langsley G, Hall R** (2000) *Loss of matrix metalloproteinase 9 activity in Theileria annulata-attenuated cells is at the transcriptional level and is associated with differentially expressed AP-1 species*. Molecular Biochemical Parasitology, 106: 51-61.

**Adler S and Ellenbogen V** (1934) *A note on the pre-immunisation of calves against Theileria annulata*. Veterinary Record, 14 91-93.

**Ahmed JS, Diesing L, Oechtering H, Ouhelli H, Schein E** (1988) *The role of antibodies in immunity against Theileria annulata infection in cattle*, Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, 267: 425-431.

**Ahmed JS, Rothert M, Steuber S, Schein E** (1989) *In vitro proliferative and cytotoxic responses of PBL from Theileria annulata-immune cattle*, Zentralbl.Veterinarmed. 36: 584-592.

**Ahmed JS, Shayan P, Hugel FU, Biermann R, Ewald CH, Schein E and Gerdes J** (1997) *Macroschizonts of Theileria annulata as vaccine and diagnostic tools*. Tropical Animal Filth Production, 29, 128S-132S.

**Aktaş M, Altay K, Dumanlı N** (2006) *A molecular survey of bovine Theileria parasites apparently healthy cattle and with a note on distribution of ticks in eastern Turkey*. Veterinary Parasitology, 138 179-185.

**Aktas M, Dumanli N, Angin M** (2004) *Cattle infestation by Hyalomma ticks and prevalence of Theileria in Hyalomma species in the east of Turkey*. Veterinary Parasitology, 119: 1-8.

**Al-Khedery B and Allred DR** (2006) *Antigenic variation in Babesia bovis occurs through segmental gene conversion of the ves multigene family, within a bidirectional locus of active transcription*. Molecular Microbiology, 59 (2); 402-414.

**Alhassan A, Govind Y, Tam NT, Thekiso OM, Yokoyama N, Inoue N, Igarashi I** (2007a) *Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmiasis*. Parasitology Research, 100: 1165-1168.

**Alhassan A, Thekiso OM, Yokoyama N, Inoue N, Motloang MY, Mbatia PA, Yin H, Katayama Y, Anzai T, Sugimoto C, Igarashi I** (2007b) *Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis*. Veterinary Parasitology, 143: 155-160.

**Allred DR, Cinque RM, Lane TJ and Ahrens KP** (1994) *Antigenic variation of parasite-derived antigens on the surface of Babesia bovis-infected erythrocytes*. Infection and Immunity, 62: 91–98.

**Allred DR, Carlton JM, Satcher RL, Long JA, Brown WC, et al.** (2000) *The ves multigene family of B. bovis encodes components of rapid antigenic variation at the infected erythrocyte surface*. Molecular Cell, 5: 153–162.

**Allsopp BA, Baylis HA, Allsopp M, Cavaliersmith T, Bishop RP, Carrington DM, Sohanpal B, Spooner P** (1993) *Discrimination between 6 species of Theileria using oligonucleotide probes which detect small-subunit ribosomal-RNA sequences*. Parasitology, 107: 157-165.

**Altay K, Aydin MF, Uluisik U, Aktas M, Dumanli N** (2008) *Use of multiplex PCR for the diagnosis of Theileria annulata and Theileria buffeli*. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32: 1-3.

**Anders RF** (1986) *Multiple cross-reactivities amongst antigens of Plasmodium falciparum impair the development of protective immunity against malaria*. Parasite Immunology, 8 529-539.

**Anderson TJ and Day KP** (2000) *Geographical structure and sequence evolution as inferred from the Plasmodium falciparum S-antigen locus*. Molecular and Biochemical Parasitology, 106 321-326.

**Anon** (1997). *Theileriosis*. In: *OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*, Paris: Office International des Epizooties. p 321-330.

**Aonuma H, Suzuki M, Iseki H, Perera N, Nelson B, Igarashi I, Yagi T, Kanuka H, Fukumoto S** (2008) *Rapid identification of Plasmodium carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 376: 671-676.

**Awadia MA, Salih D, Bakheit M, Hussein AR, Hassan SM, Mukhtar MM, Ahmed JS, and Seitzer U** (2008) *Molecular Structure of TaSP Gene of Theileria annulata*. Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annuals of NewYork Academy of Science, 1149: 218–220.

**Aysul N, Karagenç T, Eren H, Aypak S, Bakirci S** (2008) *Prevalence of Tropical Theileriosis in Cattle in the Aydin Region and Determination of Efficacy of Attenuated Theileria annulata Vaccine*. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32(4): 322-7. Turkish.

**Bakheit MA ve Latif AA** (2002) *The innate resistance of Kenana cattle to tropical theileriosis (Theileria annulata infection) in the Sudan*. Annuals of NewYork Academy of Science, 969, 159-163.

**Bakheit MA, Schnittger L, Salih DA, Boguslawski K, Beyer D, Fadl M, Ahmed JS** (2004) *Application of the recombinant Theileria annulata surface protein in an indirect ELISA for the diagnosis of tropical theileriosis*. Parasitology Reserch, 92: 299-302.



**Bakheit MA, Scholzen T, Ahmed JS, Seitzer U** (2006) *Molecular characterization of a Theileria lestoquardi gene encoding for immunogenic protein splice variants*. Parasitology Reserch, 100(1):161-70.

**Bakheit MA, Torra D, Palomino LA, Thekiso OM, Mbat PA, Ongerth J, Karanis P** (2008) *Sensitive and specific detection of Cryptosporidium species in PCR-negative samples by loop-mediated isothermal DNA amplification and confirmation of generated LAMP products by sequencing*. Veterinary Parasitology, 158: 11-22.

**Bakırcı S** (2009) *Batı Anadolu Sığırlarında Görülen Kene Türleri ve Yaygınlığı*. Doktora tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

**Barnett SF** (1977) *Theileria In Parasitic Protozoa*. Kreier JP (ed) Academic Press: New York. pp. 77-113.

**Barbet AF and Allred DR** (1991) *The msp 1 beta multigene family of Anaplasma marginale: nucleotide sequence analysis of an expressed copy*. Infection and Immunity, 59; 971–976.

**Bhatia V, Sinha M, Luxon B and Garg N** (2004) *Utility of the Trypanosoma cruzi sequence database for identification of potential vaccine candidates by in silico and in vitro screening*, Infection and Immunity, 72 6245-6254.

**Baylis HA, Megson A, Brown CG, Wilkie GF, Hall R** (1992) *Theileria annulata-infected cells produce abundant proteases whose activity is reduced by long-term cell culture*. Parasitology, 105 ( Pt 3): 417-423.

**Baylis HA, Megson A and Hall R** (1995) *Infection with Theileria-annulata induces expression of matrix metalloproteinase-9 and transcription factor AP-1 in bovine leukocytes*. Molecular and Biochemical Parasitology, 69 211-222.

**Ben Miled L** (1993) *Population in diversity in Theileria annulata in Tunisia*. Doktora tezi, University of Edinburgh: Edinburgh.

**Ben Miled L, Dellagi K, Bernard G, Melrose TR, Darghouth M, Bouattour A, Kinnaird J, Shiels B, Tait A, Brown CGD** (1994) *Genomic and phenotypic diversity of Tunisian Theileria annulata isolates*. Parasitology, 108: 51-60.

**Beniwal RK, Nichani AK, Sharma RD, Rakha NK, Suri D, Sarup S** (1997), *Responses in animals vaccinated with the Theileria annulata (Hisar) cell culture vaccine*. Tropical Animal Health Production, 29: 109S-113S.

**Bettencourt A, Franca C and Borges J** (1907) *Un cas de piroplasmose bacilliforme chez le daim*. Institut Royal de Bacteriologie Camara Pestana, 1 341-363.

**Bhannasir T, Bogart R, Krueger H** (1961) *Hemoglobin and blood cells of growing beef cattle*. Journal of Animal Science, 20, 18-21.

**Bishop R, Sohanpal B, Kariuki DP, Young AS, Nene V, Baylis H, Allsopp BA, Spooner PR, Dolan TT, Morzaria SP** (1992) *Detection of a carrier state in Theileria parva-infected cattle by the polymerase chain reaction*. Parasitology, 104 ( Pt 2), 215-232.

**Bishop RP, Spooner PR, Kanhai GK, Kiarie J, Latif AA, Hove T, Masaka S, Dolan TT** (1994) *Molecular characterization of Theileria parasites: application to the epidemiology of theileriosis in Zimbabwe*. Parasitology, 109 ( Pt 5): 573-581.

**Blood CH, Sasse J, Brodt P, Zetter BR** (1988) *Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide*. Journal of Cell Biology, 107: 1987-1993

**Boulter N, Brown D, Wilkie G, Williamson S, Kirvar E, Knight P, Glass E, Campbell J, Morzaria S, Nene V, Musoke A, d'Oliveira C, Gubbels MJ, Jongejan F, Hall R** (1999) *Evaluation of recombinant sporozoite antigen SPAG-1 as a vaccine candidate against Theileria annulata by the use of different delivery systems*. Tropical Medical International Health, 4: A71-A77.

**Boulter N, Hall R** (1999) *Immunity and vaccine development in the bovine theilerioses*. Advances in Parasitology, 44: 41-97.

**Boulter N, Knight PA, Hunt PD, Hennessey ES, Katzer F, Tait A, Williamson S, Brown D, Baylis HA, Hall R** (1994) *Theileria annulata sporozoite surface antigen (SPAG-1) contains neutralizing determinants in the C terminus*. Parasite Immunology, 16: 97-104.

**Boulter NR, Glass EJ, Knight PA, Bell-Sakyi L, Brown CG, Hall R** (1995) *Theileria annulata sporozoite antigen fused to hepatitis B core antigen used in a vaccination trial*. Vaccine, 13: 1152-1160.

**Brewer S, Tolley M, Trayer I.P, Barr GC, Dorman CJ, Hannavy K, Higgins CF, Evans JS, Levine BA and Wormald MR** (1990) *Structure and function of X-Pro dipeptide repeats in the TonB proteins of Salmonella typhimurium and Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology, 216: 883-895.

**Brown CG** (1981), *Application of in vitro techniques to vaccination against theileriosis, in Advances in the control of theileriosis*. Ed. Irvin AD, Cunningham MP, and Young AS, Martinus Nijhoff, The Hague 104-119.

**Brown CG** (1990), *Control of tropical theileriosis (Theileria annulata infection) of cattle*. Parasitologia, 32: 23-31.

**Brown DJ** (1997) *The production and study of Theileria annulata macroschizont infected cells: relating to MHC class II expression, T cell stimulatory ability, cytokine mRNA production and their use as vaccine*. Doktora tezi, University of Edinburgh: Ediburgh.

**Brown DJ, Campbell JDM, Glass E, Waddington D, Hopkins J and Spooner RL** (1998). *Cytokine production T-cell stimulatory ability of Theileria annulata infected cells and post vaccinal reactions*. Annals of the New York Academy of Sciences, 849: 412-415.

**Brown DJ, Campbell JD, Russell GC, Hopkins J, Glass EJ (1995)** *T cell activation by Theileria annulata-infected macrophages correlates with cytokine production*. Clinical and Experimental Immunology, 102: 507-514.

**Brown WC, Norimine J, Knowles DP, Goff WL (2006)** *Immune control of Babesia bovis infection*. Veterinary Parasitology, 31;138 (1-2) :75-87.

**Bruce A, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1994)** *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Publishing Inc.

**Bukau B, Horwich AL (1998)** *The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines*. Cell, 6;92 (3): 351-66.

**Burridge MJ, Brown CG, Kimber CD (1974)** *Theileria annulata: cross-reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test*. Experimental Parasitology, 35: 374-380.

**Caccio S, Camma C, Onuma M, Severini C (2000)** *The beta-tubulin gene of Babesia and Theileria parasites is an informative marker for species discrimination*. International Journal of Parasitology, 30: 1181-1185.

**Calder JA, Reddy GR, Chieves L, Courtney CH, Littell R, Livengood JR, Norval RA, Smith C, Dame JB (1996)** *Monitoring Babesia bovis infections in cattle by using PCR-based tests*. Journal of Clinical Microbiology, 34 (11): 2748-55.

**Callow LL (1984)** *Protozoan and rickettsial diseases*. In" Australian Bureau of Animal Health, Animal Health in Australia, Vol. 5. Aust. Gov. Publishing Serv., Canberra, 121-216.

**Campbell RSF (1978)** *The use of resistant cattle in the control of ticks and vector-borne diseases*. In Tick-borne Diseases and Their Vectors, Wilde, J.K.H. (ed) pp. 251-257. Lewis Reprints Ltd: University of Edinburgh, CTVM.

**Campbell JD, Brown DJ, Nichani AK, Howie SE, Spooner RL, Glass EJ (1997a)** *A non-protective T helper 1 response against the intra-macrophage protozoan Theileria annulata*. Clinical and Experimental Immunology, 108: 463-470.

**Campbell JD, Nichani AK, Brown DJ, Howie SE, Spooner RL, Glass EJ (1997b)** *Parasite-mediated steps in immune response failure during primary Theileria annulata infection*. Tropical Animal Health and Production, 29: 133S-135S.

**Carelli G, Decaro N, Lorusso A, Elia G, Lorusso E, Mari V, Ceci L, Buonavoglia C (2007)** *Detection and quantification of Anaplasma marginale DNA in blood samples of cattle by real-time PCR*. Veterinary Microbiology, 124; 107-114.

**Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT (1988)** *Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification*. Nucleic Acids Reserch, 16:11141-11156.

**Chansiri K, Kawazu S, Kamio T, Terada Y, Fujisaki K, Philippe H, Sarataphan N** (1999) *Molecular phylogenetic studies on Theileria parasites based on small subunit ribosomal RNA gene sequences*. *Veterinary Parasitology*, 83: 99-105.

**Claros MG, von Heijne G** (1994) *TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions*. *Cabios*, 10:685–686.

**Conrad PA, Iams K, Brown WC, Sohanpal B, ole-MoiYoi OK** (1987) *DNA probes detect genomic diversity in Theileria parva stocks*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 25: 213-226.

**Conrad PA, Kelly BG, Brown CG** (1985) *Intraerythrocytic schizogony of Theileria annulata*. *Parasitology*, 91 (1): 67-82.

**Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS and Massung RF** (2004) *Multiplex Real-Time PCR for Detection of Anaplasma phagocytophilum and Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42; 3164–3168.

**Craig EA, Gambill BD and Nelson RJ** (1993) *Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis*. *Microbiological Reviews*, 57(2): 402-414.

**Criado A, Martinez J, Buling A, Barba JC, Merino S, Jefferies R, Irwin PJ** (2006) *New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes*. *Veterinary Parasitology*, 142: 238-247.

**Crisan D** (1994) *Molecular diagnostic testing for determination of myeloid lineage in acute leukemias*. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 24:355–363.

**d'Oliveira C, Feenstra A, Vos H, Osterhaus AD, Shiels BR, Cornelissen AW, Jongejan F** (1997a) *Induction of protective immunity to Theileria annulata using two major merozoite surface antigens presented by different delivery systems*. *Vaccine*, 15: 1796-1804.

**d'Oliveira C, Tijhaar EJ, Shiels BR, van der WM, Jongejan F** (1996) *Expression of genes encoding two major Theileria annulata merozoite surface antigens in Escherichia coli and a Salmonella typhimurium aroA vaccine strain*. *Gene*, 172: 33-39.

**d'Oliveira C, van der WM, Habela MA, Jacquet P, Jongejan F** (1995) *Detection of Theileria annulata in blood samples of carrier cattle by PCR*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2665-2669.

**d'Oliveira C, van der WM, Jacquet P, Jongejan F** (1997b) *Detection of Theileria annulata by the PCR in ticks (Acari:Ixodidae) collected from cattle in Mauritania*. *Experimental and Applied Acarology*, 21: 279-291.

**Dalrymple BP** (1990) *Cloning and characterization of the rRNA genes and flanking regions from Babesia bovis: use of the genes as strain discriminating probes*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 43: 117-124.

**Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, Hockmeyer WT, Maloy WL, Haynes JD, Schneider I, Roberts D** (1984) *Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite Plasmodium falciparum.* Science., 10; 225 (4662): 593-9.

**Darghouth MA, Ben Miled L, Bouattour A, Melrose TR, Brown CG, Kilani M** (1996a) *A preliminary study on the attenuation of Tunisian schizont-infected cell lines of Theileria annulata.* Parasitology Reserch, 82: 647-655.

**Darghouth ME, Bouattour A, Ben Miled L, Sassi L** (1996b) *Diagnosis of Theileria annulata infection of cattle in Tunisia: comparison of serology and blood smears.* Veterinary Reserch, 27: 613-621.

**Darghouth MA, Bouattour A, Kilan M** (1999) *Tropical theileriosis in Tunisia: epidemiology and control.* Parassitologia, 41 Suppl 1: 33-36.

**Darghouth MA** (2008) *Review on the experience with live attenuated vaccines against tropical theileriosis in Tunisia: considerations for the present and implications for the future.* Vaccine, 26 Suppl 6: G4-G10.

**De Groot AS, Rappuoli R** (2004), *Genome-derived vaccines.* Expert Review of Vaccines. 3: 59-76.

**de Kok JB, d'Oliveira C, Jongejan F** (1993) *Detection of the protozoan parasite Theileria annulata in Hyalomma ticks by the polymerase chain reaction.* Experimental and Applied Acarology, 17: 839-846.

**de Vos AJ, Bessenger R, Banting LF** (1981) *Theileria taurotragi: a probable agent of bovine cerebral theileriosis.* Onderstepoort Journal of Veterinary Reserch, 48: 177-178.

**Dickson J, Shiels BR** (1993) *Antigenic diversity of a major merozoite surface molecule in Theileria annulata.* Molecular and Biochemical Parasitology, 57: 55-64.

**Dobbelaere DAE, Coquerelle TM, Roditi IJ, Eichhorn M and Williams RO** (1988) *Theileria parva infection induces autocrine growth of bovine lymphocytes.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85: 4730-4734.

**Dolan TT, Teale AJ, Stagg DA, Kemp SJ, Cowan KM, Young AS, Grocock CM, Leitch BL, Spooner RL, Brown CG** (1984) *A histocompatibility barrier to immunization against East Coast fever using Theileria parva-infected lymphoblastoid cell lines.* Parasite Immunology, 6: 243-250.

**Dolan TT** (1986) *Chemotherapy of East Coast fever. Treatment of infections induced by isolates of Theileria parva with halofuginone.* Acta Tropica, 43: 165-173.

**Dschunkowsky E and Luhs J** (1904) *Die piroplasmen der rinder, zentralblatt fur bacteriology, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung I. originale, 35, 486-492.*

**Dumanli N, Aktas M, Cetinkaya B, Cakmak A, Koroglu E, Saki CE, Erdogmus Z, Nalbantoglu S, Ongor H, Simsek S, Karahan M, Altay K (2005) *Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey*. Veterinary Parasitology, 127: 9-15.**

**Edwards M C and Gibbs R A (1994) *Multiplex PCR: advantages, development, and applications*. Genome Research, 3: 65-75.**

**Endo T, Ikeo K, Gojobori T (1996) *Large-scale search for genes on which positive selection may operate*. Molecular Biology and Evolution, 13: 685-690.**

**Eren H, Çakmak A, Yukarı BA (1995) *Türkiye' nin farklı bölgelerinde Theileria annulata'nın sero-prevalansı*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 42 1: 57-60.**

**Eren H, Özlem BM, Sert H, Kaplan A (1998) *Aydın yöresi sığırlarında Theileria annulata (Dscjunksowsky ve Luns)'nın prevalansı*, Türkiye Parazitoloji Dergisi 22 (2): 177-179.**

**Estrada-Pena A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR (2004) *Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region*. 1st edition University of Zaragoza, Spain.**

**Fahrimal Y, Goff WL, Jasmer DP (1992) *Detection of Babesia bovis carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA*. Journal of Clinical Microbiology, 30(6):1374-9.**

**Fawcett D, Musoke A, Voigt W (1984) *Interaction of sporozoites of Theileria parva with bovine lymphocytes in vitro. I. Early events after invasion*, Tissue Cell 16: 873-884.**

**Fawcett DW, Buscher G, Doxsey S (1982a) *Salivary gland of the tick vector of East Coast fever. IV. Cell type selectivity and host cell responses to Theileria parva*. Tissue Cell, 14: 397-414.**

**Fawcett DW, Doxsey S, Stagg DA, Young AS (1982b) *The entry of sporozoites of Theileria parva into bovine lymphocytes in vitro. Electron microscopic observations*, Eur.J.Cell Biol. 27: 10-21.**

**Fich C, Klauenberg U, Fleischer B and Broker BM (1998) *Modulation of enzymatic activity of Src-family kinases in bovine T cells transformed by Theileria parva*. Parasitology, 117: 107-115.**

**Fields S, Kohara Y, Lockhart DJ (1999) *Functional genomics*. Proceeding in National Academy of Science USA, 96: 8825-8826.**

**Figuroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM (1993) *Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of Babesia bigemina, Babesia bovis and Anaplasma marginale DNA in bovine blood*. Veterinary Parasitology, 50: 69-81.**

**Figuroa JV, Alvarez JA, Canto GJ, Ramos JA, Mosqueda JJ, Buening GM (1996) *Comparative Sensitivity of Two Tests for the Diagnosis of Multiple Hemoparasite Infection of Cattle*. Annals of New York Academy of Science, 23;791: 117-2.**

**Figueroa JV, Alvarez JA, Ramos JA, Rojas EE, Santiago C, Mosqueda JJ, Vega CA, Buening GM (1998)** *Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases*. Annals of New York Academy of Science, 29; 849: 1–10.

**Flach EJ, Ouhelli H (1992)** *The epidemiology of tropical theileriosis (Theileria annulata infection in cattle) in an endemic area of Morocco*. Veterinary Parasitology, 44: 51-65.

**Forsyth LM, Minns FC, Kirvar E, Adamson RE, Hall FR, McOrist S, Brown CG, Preston PM (1999)** *Tissue damage in cattle infected with Theileria annulata accompanied by metastasis of cytokine-producing, schizont-infected mononuclear phagocytes*. Journal of Comparative Pathology, 120: 39-57.

**Friedhoff KT (1988)** *Transmission of Babesia*. In: Ristic, M. (Ed.), Babesiosis of Domestic Animals and Man. CRC Press, Boca Raton, FL, 23–52.

**Gardner MJ, Bishop R, Shah T, de Villiers EP, Carlton JM, Hall N, Ren Q, Paulsen IT, Pain A, Berriman M, Wilson RJ, Sato S, Ralph SA, Mann DJ, Xiong Z, Shallom SJ, Weidman J, Jiang L, Lynn J, Weaver B, Shoaibi A, Domingo AR, Wasawo D, Crabtree J, Wortman JR, Haas B, Angiuoli SV, Creasy TH, Lu C, Suh B, Silva JC, Utterback TR, Feldblyum TV, Perteua M, Allen J, Nierman WC, Taracha EL, Salzberg SL, White OR, Fitzhugh HA, Morzaria S, Venter JC, Fraser CM, Nene V (2005)** *Genome sequence of Theileria parva a bovine pathogen that transforms lymphocytes*. Science, 309: 134-137.

**Georges K, Loria GR, Riili S, Greco A, Caracappa S, Jongejan F, Sparagano O (2001)** *Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily*. Veterinary Parasitology, 99: 273-286.

**Gharbi M, Sassi L, Dorchie P, Darghouth MA (2006)** *Infection of calves with Theileria annulata in Tunisia: Economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination*. Veterinary Parasitology, 137: 231-241.

**Gill BS, Bansal GC, Bhattacharyulu Y, Kaur D, Singh A (1980)** *Immunological relationship between strains of Theileria annulata Dschunkowsky and Luhs 1904*. Research in Veterinary Science, 29: 93-97.

**Gill BS, Bhattacharyulu Y, Kaur D, Singh A (1976)** *Vaccination against bovine tropical theileriosis (Theileria annulata)*. Nature, 264: 355-356.

**Gill BS, Bhattacharyulu Y, Singh A, Kaur D (1984)** *Chemotherapy of bovine tropical theileriosis: Theileria annulata infection*. Research in Veterinary Science, 37: 247-248

**Gill P and Ghaemi A (2008)** *Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies—A Review*, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 27:3, 224 — 243.

**Glascodine J, Tetley L, Tait A, Brown D, Shiels B (1990)** *Developmental expression of a Theileria annulata merozoite surface antigen*. Molecular and Biochemical Parasitology, 40: 105-112.

**Glass EJ, Innes EA, Spooner RL, Brown CG (1989)** *Infection of bovine monocyte/macrophage populations with Theileria annulata and Theileria parva*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 22: 355-368.

**Glass EJ, Preston PM, Springbett A, Craigmile S, Kirvar E, Wilkie G, Brown CG (2005)** *Bos taurus and Bos indicus (Sahiwal) calves respond differently to infection with Theileria annulata and produce markedly different levels of acute phase proteins*. International Journal of Parasitology, 35: 337-347.

**Graham SP, Pelle R, Honda Y, Mwangi DM, Tonukari NJ, Yamage M, Glew EJ, de Villiers EP, Shah T, Bishop R, Abuya E, Awino E, Gachanja J, Luyai AE, Mbwika F, Muthiani AM, Ndegwa DM, Njahira M, Nyanjui JK, Onono FO, Osaso J, Saya RM, Wildmann C, Fraser CM, Maudlin I, Gardner MJ, Morzaria SP, Loosmore S, Gilbert SC, Audonnet JC, van der BP, Nene V, Taracha EL (2006)** *Theileria parva candidate vaccine antigens recognized by immune bovine cytotoxic T lymphocytes*, Proceedings in National Academy of Science USA, 103: 3286-3291.

**Gray MA, Luckins AG, Rae PF, Brown CG (1980)** *Evaluation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of infections with Theileria parva and T annulata*. Research in Veterinary Science, 29: 360-366.

**Gray MA, Brown CG (1981)**, *Advances in the control of theileriosis*, 127-129.

**Greiner M (1995a)** *Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): a Microsoft-EXCEL template for the selection of cut-off values in diagnostic tests*. Journal of Immunological Methods, 185: 145-146.

**Greiner M, Bhat TS, Patzelt RJ, Kakaire D, Schares G, Dietz E, Bohning D, Zessin KH and Mehlitz D (1997)** *Impact of biological factors on the interpretation of bovine trypanosomiasis serology*. Preventive Veterinary Medicine, 30: 61-73.

**Greiner M, Franke CR, Bohning D, Schlattman P (1994)** *Construction of an intrinsic cut-off value for the sero-epidemiological study of Trypanosoma evansi infections in a canine population in Brazil: a new approach towards an unbiased estimation of prevalence*. Acta Tropica, 56: 97-109

**Greiner M, Sohr D and Gobel P (1995b)** *A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests*. Journal of Immunological Methods, 185: 123-132.

**Goff W, Barbet A, Stiller D, Palmer G, D Knowles, Kocan K, Gorha J and McGuire T (1988)** *Detection of Anaplasma marginale infected tick vectors by using a cloned DNA probe*, Proceeding in National Academy of Science USA, 85: 919-923.

**Guan G, Chauvin A, Luo J, Inoue N, Moreau E, Liu Z, Gao J, Thekiso OM, Ma M, Liu A, Dang Z, Liu J, Ren Q, Jin Y, Sugimoto C, Yin H (2008)** *The development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of Babesia spp. infective to sheep and goats in China*. Experimental Parasitology, 120: 39-44.



**Gubbels JM, De Vos AP, van der WM, Viseras J, Schouls LM, de Vries E, Jongejan F** (1999) *Simultaneous detection of bovine Theileria and Babesia species by reverse line blot hybridization*. Journal of Clinical Microbiology, 37: 1782-1789.

**Gubbels MJ, Katzer F, Hide G, Jongejan F, Shiels BR** (2000) *Generation of a mosaic pattern of diversity in the major merozoite-piroplasm surface antigen of Theileria annulata*. Molecular and Biochemical Parasitology, 110: 23-32.

**Gubbels MJ, Katzer F, Shiels BR, Jongejan F** (2001) *Study of Theileria annulata population structure during bovine infection and following transmission to ticks*. Parasitology, 123: 553-561.

**Hagiwara K, Ichikawa T, Takahashi K** (1996) *Studies on an experimental system for the invasion of Theileria sergenti merozoite into erythrocytes*. Veterinary Parasitology, 63: 187-193.

**Hagiwara K, Takahashi M, Ichikawa T, Tsuji M, Ikuta K, Ishihara C** (1997) *Inhibitory effect of heparin on red blood cell invasion by Theileria sergenti merozoites*. International Journal of Parasitology, 27: 535-539.

**Hall N, Karras M, Raine JD, Carlton JM, Kooij TW, Berriman M, Florens L, Janssen CS, Pain A, Christophides GK, James K, Rutherford K, Harris B, Harris D, Churcher C, Quail MA, Ormond D, Doggett J, Trueman HE, Mendoza J, Bidwell SL, Rajandream MA, Carucci DJ, Yates JR 3rd, Kafatos FC, Janse CJ, Barrell B, Turner CM, Waters AP, Sinden RE** (2005) *A comprehensive survey of the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses*. Science, 7;307(5706):82-6.

**Hall R** (1988) *Antigens and immunity in Theileria annulata*. Parasitology Today, 4: 257-261

**Hall R, Coggins L, McKellar S, Shiels B, Tait A** (1990) *Characterisation of an extrachromosomal DNA element from Theileria annulata*. Molecular and Biochemical Parasitology, 38: 253-260.

**Hall R, Hunt PD, Carrington M, Simmons D, Williamson S, Mecham RP, Tait A** (1992) *Mimicry of elastin repetitive motifs by Theileria annulata sporozoite surface antigen*. Molecular and Biochemical Parasitology, 53: 105-112.

**Hashemi-Fesharki R** (1988) *Control of Theileria annulata in Iran*. Parasitology Today, 4: 36-40.

**Hashemi-Fesharki R.** (1991) *Prophylactic effect of schizont tissue culture vaccine against Theileria annulata infection in Iran* 15-17. Anand, India, National Dairy Development Board. Proceedings of the second EEC workshop on orientation and co-ordination of research on tropical theileriosis.

**Hashemi-Fesharki R, Shad-Del F** (1974) *The therapeutic value of oxytetracycline hydrochloride (Terramycin) in cattle infected experimentally with Theileria annulata*. Tropical Animal Health and Production, 6: 119-121.

**Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N** (1998) *Single step multiplex PCR assay for characterization of New World Leishmania complexes*. Journal of Clinical Microbiology, 36:1989–1995.

**Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH and Vogt PH** (1997) *Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by Step Protocol*. Biotechniques, 23: 504-511.

**Hendolin PH, Markkanen A, Ylikoski J, Wahlfors JJ** (1997) *Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions*. Journal of Clinical Microbiology, 35:2854–2858.

**Heussler VT, Eichhorn M, Reeves R, Magnuson N.S, Williams RO and Dobbelaere DAE** (1992) *Constitutive IL-2 messenger-RNA expression in lymphocytes, infected with the intracellular parasite Theileria parva*. Journal of Immunology, 149: 562-567.

**Heredia A, Soriano V, Weiss SH, et al.** (1996) *Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of HIV-1, HIV-2, HTLV-I and HTLV-II*. Clinical Diagnostic Virology, 7:85–92.

**Heussler VT, Rottenberg S, Schwab R, Ku'enzi P, Fernandez P, McKellar S, Shiels B, Chen Z, Orth K, Wallach D, Dobbelaere DAE,** (2002) *Hijacking of host cell IKK signalosomes by the transforming parasite Theileria*. Science, 298: 1033–1036.

**Hiroshi I, Alhassan A, Ohta N, Thekiso OM, Yokoyama N, Inoue N, Nambota A, Yasuda J, Igarashi I** (2007) *Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine Babesia parasites.*, Journal of Microbiological Methods, 71: 281–287.

**Holden P and Horton WA** (2009) *Crude subcellular fractionation of cultured mammalian cell lines*. BMC Research Notes, 2:243.

**Hooshmand-Rad P** (1973) *Some studies on Theileria annulata with special reference to an attenuated vaccine*. Doktora tezi, University of Edinburgh: Edinburgh..

**Hooshmand-Rad P** (1976) *The pathogenesis of anaemia in Theileria annulata infection*. Research in Veterinary Science, 20: 324-329.

**Ica A, Vatansever Z, Yildirim A, Duzlu O, Inci A** (2007) *Detection of Theileria and Babesia species in ticks collected from cattle*. Veterinary Parasitology, 148: 156-160.

**Ikadai H, Tanaka H, Shibahara N, Matsuu A, Uechi M, Itoh N, Oshiro S, Kudo N, Igarashi I, Oyamada T** (2004) *Molecular evidence of infections with Babesia gibsoni parasites in Japan and evaluation of the diagnostic potential of a loop-mediated isothermal amplification method*. Journal of Clinical Microbiology, 42: 2465-2469.

**Ilhan T.** (1999) *Diagnostic methods for epidemiological studies of tropical theileriosis (Theileria annulata infection of cattle)*. Doktora tezi, University of Edinburgh.

**Ilhan T, Williamson S, Kirvar E, Shiels B, Brown CG** (1998) *Theileria annulata: carrier state and immunity*. Annals of New York Academy of Science, 849: 109-125.

**Innes EA, Ouhelli H, Oliver RA, Simpson SP, Brown CG, Spooner RL** (1989) *The effect of MHC compatibility between parasite-infected cell line and recipient in immunization against tropical theileriosis*. Parasite Immunology, 11: 47-56.

**Irvin AD** (1985) *Immunity in theileriosis*. Parasitology Today, 1: 124-128.

**Irvin AD, Morrison IW** (1987) *Immunopathology, immunology, and immunoprophylaxis of Theileria infections, in Immune responses in parasitic infections: Immunology, immunopathology and immunoprophylaxis of Theileria infections*. Ed. Soulsby E.J.L, CRC Press Inc, Baton Rouge, Florida, 223-274.

**Iseki H, Alhassan A, Ohta N, Thekiso OM, Yokoyama N, Inoue N, Nambota A, Yasuda J, Igarashi I** (2007) *Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine Babesia parasites*. Journal of Microbiologic Methods, 71: 281-287.

**Ivanov V, Stein B, Baumann I, Dobbelaere DAE, Herrlich P and Williams RO** (1989) *Infection with the intracellular protozoan parasite Theileria-parva induces constitutively high-levels of Nf-Kappa-B in bovine lymphocytes-T*. Molecular and Cellular Biology, 9: 4677-4686.

**Jacobson R** (1996) *Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases*. In Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, Commission, O.I.E.S. (ed) 8-15. Office International de Epizooties: Paris.

**Jakob U, Buchner J** (1994) *Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones*. Trends in Biochemical Science, 19(5):205-11.

**Jefferies R, Ryan UM, Irwin PJ** (2007) *PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies*. Veterinary Parasitology, 15;144(1-2):20-7.

**Jongejan F and Uilenberg G** (1994) *Ticks and control methods*. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 13:1201–1226.

**John SantaLucia Jr.** (1998) *A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics*. Proceeding in National Academy of Science USA, 95 (4): 1460–5.

**Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK** (2008) *Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on Bos indicus cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia*. *Veterinary Parasitology*, 155: 1–9.

**Julian C, Gray P H, Corran E M, Michael W G, Qiuxiang L, Kevin KA, Tetteh S D, Polley D J, Conway A A H, Tito BH, Eleanor MR, and Andrea Crisanti** (2007) *Profiling the Antibody Immune Response against Blood Stage Malaria Vaccine Candidates*. *Clinical Chemistry*, 53:7 1244–1253.

**Jura WG** (1984) *Factors affecting the capacity of Theileria annulata sporozoites to invade bovine peripheral blood lymphocytes*. *Veterinary Parasitology*, 16: 215-223.

**Jura WG, Brown CG, Kelly B** (1983) *Fine structure and invasive behaviour of the early developmental stages of Theileria annulata in vitro*, *Vet.Parasitol.* 12: 31-44.

**Kachani M, Spooner RL, Rae P, Bell-Sakyi L and Brown CGD** (1992a) *Stage-specific responses following infection with Theileria annulata as evaluated using ELISA*. *Parasitology Research*, 78: 43-47.

**Kachani M, Oliver RA, Brown CG, Ouhelli H, Spooner RL** (1992b) *Common and stage-specific antigens of Theileria annulata*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 34: 221-234.

**Kachani M, Flach E, Williamson S, McDonald F, Shiels B, Spooner RL and Ouhelli HI**. (1994) *The use of ELISA in theileriosis studies in Morocco*. In *Third European Coordination Meeting on Tropical Theileriosis*, R. Spooner and Campbell, J. (eds) 49-51: Antalya, Turkey.

**Kachani M, Flach EJ, Williamson S, Ouhelli H, ElHasnaoui M and Spooner RL** (1996) *The use of an enzyme-linked immunosorbent assay for tropical theileriosis research in Morocco*. *Preventive Veterinary Medicine*, 26: 329-339.

**Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T** (2007) *Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances*. *Journal of Biochemical Biophysical Methods*, 70: 499–501.

**Karanis P, Thekiso O, Kiouptsi K, Ongerth J, Igarashi I, Inoue N** (2007) *Development and preliminary evaluation of a loop-mediated isothermal amplification procedure for sensitive detection of cryptosporidium oocysts in fecal and water samples*. *Applied Environmental Microbiology*, 73: 5660-5662.

**Kariuki DP, Young AS, Morzaria SP, Lesan AC, Mining SK, Omwoyo P, Wafula JL, Molyneux DH** (1995) *Theileria parva carrier state in naturally infected and artificially immunised cattle*. *Tropical Animal Health and Production*, 27: 15-25.

**Katzer F, Carrington M, Knight P, Williamson S, Tait A, Morrison IW, Hall R** (1994) *Polymorphism of SPAG-1, a candidate antigen for inclusion in a sub-unit vaccine against Theileria annulata*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 67: 1-10.

**Katzer F, McKellar S, Ben Miled L, d'Oliveira C, Shiels B** (1998) *Selection for antigenic diversity of Tams1, the major merozoite antigen of Theileria annulata*. Annals of New York Academy of Science, 849: 96-108.

**Katzer F, McKellar S, Ferguson MA, d'Oliveira C, Shiels BR** (2002) *A role for tertiary structure in the generation of antigenic diversity and molecular association of the Tams1 polypeptide in Theileria annulata*. Molecular and Biochemical Parasitology, 122: 55-67.

**Kelly AB, Lowell SK, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC and Knowles DP Jr** (2004) *Complete genome sequencing of Anaplasma marginale reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins*. Proceedings of National Academy of Science USA, 102; 844–849.

**Kelly AB, Lau AOT, Herndon DR, Hannick L, Kappmeyer LS, Berens SJ, Bidwell SL, Brown WC, Crabtree J, Fadrosch D, Feldblum T, Forberger HA, Haas BJ, Howell JB, Khouri H, Koo H, Mann DJ, Norimine J, Paulsen IT, Radune D, Ren Q, Smith RK Jr, Suarez CE, White O, Wortman JR, Knowles DP Jr, McElwain TF, Nene VM** (2007) *Genome Sequence of Babesia bovis and Comparative Analysis of Apicomplexan Hemoprotozoa*. PLoS Pathogens, 3(10): e148.

**Kemeny DM and Chantler S** (1988) *An introduction to ELISA*. In ELISA and other solid Phase Immunoassays. Theoretical and Practical Aspects, D. M. Kemeny and Challacombe, S.J. (eds) 1-30. John Wiley and Son Ltd: Chichester.

**Kemeny DM** (1992) *Titration of antibodies*. Journal of Immunological Methods, 150: 57-76.

**Khanna BM, Kharole MU, Dhar S and Gautam OP** (1980) *Pathogenesis of lesion in bovine cerebral theileriosis*. In Haemoprotozoan Diseases of Domestic Animals, O. P. Gautam, R. D. Sharma and Dhar, S. (eds). Haryana Agricultural University, Hisar 125004: India.

**Kibe MK, ole-MoiYoi OK, Nene V, Khan B, Allsopp BA, Collins NE, Morzaria SP, Gobright EI, Bishop RP** (1994) *Evidence for two single copy units in Theileria parva ribosomal RNA genes*. Molecular and Biochemical Parasitology, 66: 249-259.

**Kiltz HH, Uilenberg G, Franssen FF, Perie NM** (1986) *Theileria orientalis occurs in Central Africa*. Research in Veterinary Science, 40: 197-200.

**Kirvar E, Ilhan T, Katzer F, Hooshmand-Rad P, Zweygarth E, Gerstenberg C, Phipps P, Brown CG** (2000) *Detection of Theileria annulata in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences*. Parasitology, 120 (Pt 3): 245-254.

**Kitayama S, Ikeda T, Mitsuhashi C, Sato T, Morita K and Dohi T** (1999) *Dominant negative isoform of rat norepinephrine transporter produced by alternative RNA splicing*. Journal of Biological Chemistry, 274: 10731-10736.

- Knight PA, Williamson SW, Brown CGD, BellSakyi L, Kirvar E, Kinnaird J, Hussain K, Hall R, Boulter N and Tait A** (1998) *Identification of a Theileria annulata antigen expressed in multiple stages of the parasite life cycle*. *Experimental Parasitology*, 90: 110-121.
- Kocan KM, Edmour F Bloun EF and Barbet AF** (2000) *Anaplasmosis Control Past, Present, and Future*. *Annals of New York Academy Of Sciences*, 916:501-9. Review.
- Kubota S, Sugimoto C, Kakuda T, Onuma M** (1996) *Analysis of immunodominant piroplasm surface antigen alleles in mixed populations of Theileria sergenti and T. buffeli*. *International Journal of Parasitology*, 26: 741-747.
- Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, Di Cello F, Grab DJ, Suzuki H, Sugimoto C, Igarashi I** (2003) *Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes*. *Jourlna of Clinical Microbiology*, 41: 5517-5524.
- Kuen LS, Ming CH and Fan YP** (1993) *Background noise in ELISA procedures: influence of the pH of the coating buffer and correlations with serum IgM concentration*. *Journal of Immunological Methods*, 163: 277-278.
- Laiblin C** (1978) *Clinical studies on Theileria annulata infection in cattle. II. Hematological studies*. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 91: 48-50.
- Lau AO** (2009) *An overview of the Babesia, Plasmodium and Theileria genomes: a comparative perspective*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 164: 1-8.
- Lawrence JA, De Vos AJ and Irvin AD** (1994) *Theileriosis. In Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. J. A. W. Coetzer, G. R. Thomson and Tustin, R.C. (eds) pp. Chapter 26. Oxford University: Cape Down..
- Lawrence JA** (1997) *Conventional vaccines for tick-borne haemoparasitic diseases of sheep and goats*. *Parassitologia*, 39: 119-121.
- Lawrence JA** (2006) *Theileriosis of sheep and goats, in Infectious Diseases of Livestock, Ed. J.A.W.Coetzer & R.C.Tustin*. Oxford University Press,Oxford, 498-501.
- Law Chansiri rence JA, Perry BD, Williamson SM** (2006) *East Coast Fever, in Infectious Diseases of Livestock, ed. J.A.W.Coetzer & R.C.Tustin*. OxfordUniversity Press, Oxford, 448-467.
- Lawrence JA, Williamson SM** (2006a) *Theileria mutans infection, in Infectious Diseases of Livestock, ed. J.A.W.Coetzer & R.C.Tustin*. Oxford University Press, Oxford, 480-482.
- Lawrence JA, Williamson SM** (2006b) *Turning sickness, in Infectious Diseases of Livestock, ed. J.A.W.Coetzer & R.C.Tustin*. Oxford University Press,Oxford, 475-477.

**Leemans I, Brown D, Fossum C, Hooshmand-Rad P, Kirvar E, Wilkie G, Uggla A** (1999a) *Infectivity and cross-immunity studies of Theileria lestoquardi and Theileria annulata in sheep and cattle: II. In vitro studies*. Veterinary Parasitology, 82: 193-204.

**Leemans I, Brown D, Hooshmand-Rad P, Kirvar E, Uggla A** (1999b) *Infectivity and cross-immunity studies of Theileria lestoquardi and Theileria annulata in sheep and cattle: I. In vivo responses*. Veterinary Parasitology, 82: 179-192.

**Levine ND** (1985) *Apicomplexa: The Piroplasms*. Veterinary Parasitology, 291-328.

**Levine NO** (1988) *The protozoan phylum Apicomplexa*. Vol. I and II. CRC press: Boca Raton, Florida, USA.

**Lomuro MLE** (1992) *The isolation and characterisation of Theilerial antigens and their use in discriminatory serodiagnostic immunoassays for Southern Sudan*. M.Phil, University of Edinburgh: Edinburgh.

**Liu Z, Hou J, Bakheit MA, Salih DA, Luo J, Yin H, Ahmed JS, Seitzer U** (2008) *Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid diagnosis of ovine theileriosis in China*. Parasitology Research, 103: 1407–1412.

**Machugh ND, Burrells AC and Morrison WI** (2008) *Demonstration of strain-specific CD8 T cell responses to Theileria annulata*. Parasite Immunology, 30(8): 385–393.

**Maione D, Margarit I, Rinaudo CD, Massignani V, Mora M, Scarselli M, Tettelin H, Brettoni C, Iacobini ET, Rosini R, D'Agostino N, Miorin L, Buccato S, Mariani M, Galli G, Nogarotto R, Nardi D, V, Vegni F, Fraser C, Mancuso G, Teti G, Madoff LC, Paoletti LC, Rappuoli R, Kasper DL, Telford JL, Grandi G** (2005) *Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen*. Science, 309: 148-150.

**Manuja A, Nichani AK, Kumar R, Rakha NK, Kumar B, Sharma RD** (2000) *Comparison of cellular schizont, soluble schizont and soluble piroplasm antigens in ELISA for detecting antibodies against Theileria annulata*. Veterinary Parasitology, 87(2-3): 93-101.

**Markoulatos P, Georgopoulou A, Kotsovassilis C, Karabogia-Karaphillides P, Spyrou N** (2000) *Detection and typing of HSV-1, HSV-2 and VZV by a multiplex polymerase chain reaction*. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2000;14:214–219.

**Markoulatus P, Siafakas N and Moncany M** (2002) *Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach*. Journal of Clinical Analysis, 16: 47-51.

**Martin-Sanchez J, Viseras J, Adroher FJ, Garcia-Fernandez P** (1999) *Nested polymerase chain reaction for detection of Theileria annulata and comparison with conventional diagnostic techniques: its use in epidemiology studies*. Parasitology Research, 85: 243-245.

**Martins TM, Pedro OC, Caldeira RA, do Rosário VE, Neves L, Domingos A (2008)** *Detection of bovine babesiosis in Mozambique by a novel seminested hot-start PCR method.* Veterinary Parasitology, 31;153(3-4):225-30.

**Matita G, (1994)** *Stage-specific diagnostic enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for Theileria annulata.* Yüksek lisans tezi, The University of Edinburgh: Edinburgh.

**Mboloi MM, Bekker CPJ, Kruitwagen C, Greiner M and Jongejan F (1999)** *Validation of the indirect MAP-1B enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of experimental Cowdria ruminantium infection in small ruminants.* Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 66-72.

**McHardy N and Morgan DWT (1985)** *Treatment of Theileria annulata infection in calves with parvaquone.* Research in Veterinary Science, 39: 1-4.

**McHardy N, Haigh AJ ve Dolan TT (1976).** *Chemotherapy of Theileria parva infection.* Nature, 261: 698-699.

**McHardy N, Wekesa LS, Hudson AT, Randall AW (1985)** *Antitheilerial activity of BW720C (buparvaquone): a comparison with parvaquone.* Research in Veterinary Science, 39: 29-33.

**McKeever DJ, Taracha EL, Innes EL, MacHugh ND, Awino E, Goddeeris BM, Morrison WI (1994)** *Adoptive transfer of immunity to Theileria parva in the CD8+ fraction of responding efferent lymph.* Proceedings of National Academy of Science USA, 91: 1959-1963.

**Mecham RP, Hinek A, Entwistle R, Wrenn DS, Griffin GL, Senior RM (1989)** *Elastin binds to a multifunctional 67-kilodalton peripheral membrane protein.* Biochemistry, 28: 3716-3722.

**Megson A, Inman GJ, Hunt PD, Baylis HA, Hall R (1991)** *The gene for apocytochrome B of Theileria annulata resides on a small linear extrachromosomal element.* Molecular and Biochemical Parasitology, 48: 113-115.

**Mehlhorn H (1984)** *The piroplasms: life cycle and sexual stages.* Advances in Parasitology, 23: 103.

**Metz CE (1998)** *ROCKIT 0.9B. Beta Version,* [www-radiology.uchicago.edu/krl/toppage11.htm](http://www-radiology.uchicago.edu/krl/toppage11.htm).

**Mimoğlu M, Göksu K, Sayın F (1969)** *Veteriner ve Tıbbi Protozooloji,* Ankara Üniversitesi Basımevi s: 980-981.

**Minami T, Spooner PR, Irvin AD, Ocamo JGR, Dobbelaere DAE and Fujinaga T (1983)** *Characterization of stocks of Theileria parva by monoclonal antibody profiles.* Research in Veterinary Science, 35: 334-340.



**Miranda J, Bakheit M, Schneider I, Haller D, Ahmed JS, Yin H, Oliva AG and Seitzer U** (2006) *Identification of Homologous Genes of T. annulata Proteins in the Genome of Theileria sp. (China)*. Annals of New York Academy of Science, 1081: 468–470.

**Miranda J, Stumme B, Beyer D, Cruz H, Oliva AG, Bakheit M, Wicklein D, Yin H, Lou J, Ahmed JS, Seitzer U** (2004) *Identification of antigenic proteins of a Theileria species pathogenic for small ruminants in China recognized by antisera of infected animals*. Annals of New York Academy of Science, 1026: 161-164.

**Mishra AK, Sharma NN, Viswanathan CB** (1993) *Efficacy of Butalex in field cases of bovine theileriosis*-short communication. Acta Veterinaria Hungarica, 41: 361-363.

**Molad T, Mazuz ML, Fleiderovitz L, Fish L, Savitsky I, Krigel Y, Leibovitz B, Mollay J, Jongehan J, Shkap V** (2006) *Molecular and serological detection of A. centrale and A. marginale infected cattle grazing within an endemic area*. Veterinay Microbiology, 113; 55-62.

**Molano A, Segura C, Guzman F, Lozada D, Patarroyo ME** (1992) *In human malaria protective antibodies are directed mainly against the Lys-Glu ion pair within the Lys-Glu-Lys motif of the synthetic vaccine SPf 66*. Parasite Immunology, 14: 111-124.

**Montigiani S, Falugi F, Scarselli M, Finco O, Petracca R, Galli G, Mariani M, Manetti R, Agnusdei M, Cevenini R, Donati M, Nogarotto R, Norais N, Garaguso I, Nuti S, Saletti G, Rosa D, Ratti G, Grandi G** (2002) *Genomic approach for analysis of surface proteins in Chlamydia pneumoniae*. Infection and Immunity, 70: 368-379.

**Moran MC, Nigarura G, Pegram RG** (1996) *An assessment of host resistance to ticks on cross-bred cattle in Burundi*. Medical Veterinary Entomology, 10: 12-18.

**Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T** (2001) *Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation*, Biochem.Biophys.Res.Comm. 289: 150-154.

**Morrison WI, Goddeeris BM, Teale AJ** (1987a) *Bovine cytotoxic T cell clones which recognize lymphoblasts infected with two antigenically different stocks of the protozoan parasite Theileria parva*. European Journal of Immunology, 17: 1703-1709

**Morrison WI, Goddeeris BM, Teale AJ, Grocock CM, Kemp SJ, Stagg DA** (1987b) *Cytotoxic T-cells elicited in cattle challenged with Theileria parva (Muguga): evidence for restriction by class I MHC determinants and parasite strain specificity*. Parasite Immunology, 9: 563-578.

**Morrison WI** (1996) *Influence of host and parasite genotypes on immunological control of Theileria parasites*. Parasitology, 112 Suppl: S53-S66.

**Morrison WI, MacHugh ND, Lalor PA** (1996) *Pathogenicity of Theileria parva is influenced by the host cell type infected by the parasite*. Infection and Immunity, 64: 557-562.

- Morrison WI, McKeever DJ** (1998) *Immunology of infections with Theileria parva in cattle*. *Chemical Immunology*, 70: 163-185.
- Morrison WI, Taracha EL, McKeever DJ** (1995) *Theileriosis: progress towards vaccine development through understanding immune responses to the parasite*. *Veterinary Parasitology*, 57: 177-187.
- Muhammed SI, Lauerman LH, Jr., Johnson LW** (1975) *Effect of humoral antibodies on the course of Theileria parva infection (East Coast fever) of cattle*. *American Journal of Veterinary Research*, 36: 399-402.
- Musembi S, Janoo R, Sohanpal B, Ochanda H, ole-Moiyoi O, Bishop R, Nene V** (2000) *Screening for Theileria parva secretory gene products by functional analysis in Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 109: 81-87.
- Musoke A, Morzaria S, Nkonge C, Jones E, Nene V** (1992) *A recombinant sporozoite surface antigen of Theileria parva induces protection in cattle*. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 89: 514-518.
- Nadeau K, Das A, Walsh CT** (1993) *Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(2):1479-87.
- Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T** (2001) *Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template*. *Clinical Chemistry*, 47: 1742-1743.
- Neitz WO** (1957) *Theileriosis, gonderioses and cyauxzoonoses: a review*. *Gonderia annulata infection*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 27: 319-346.
- Ngumi PN, Young AS, Lampard D, Mining SK, Ndungu SG, Lesan AC, Williamson SM, Linyonyi A, Kariuki DP** (1992) *Further evaluation of the use of buparvaquone in the infection and treatment method of immunizing cattle against Theileria parva derived from African buffalo (Syncerus caffer)*. *Veterinary Parasitology*, 43: 15-24.
- Norval RA, Perry BD, Young AS.** (1992) *The Epidemiology of Theileriosis in Africa*. Academic Press, London.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T** (2000) *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. *Nucleic Acids Research*, 28, E63.
- O'Connor RM, Allred DR** (2000) *Selection of Babesia bovis infected erythrocytes for adhesion to endothelial cells coselects for altered variant erythrocyte surface antigen isoforms*. *Journal of Immunology*, 164: 2037-2045.

**Okong'o-Odera EA, Kurtzhals JA, Hey AS, Kharazmi A.** (1993) *Measurement of serum antibodies against native Leishmania gp63 distinguishes between ongoing and previous L. donovani infection*, Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica 101(8):642–646.

**Ouhelli H, Spooner R, El Hasnaoui M, Kachani M, Williamson S and Flach E** (1994) *Review of immunisation against theileriosis in Morocco*. In Third European Union Coordination Meeting on Tropical Theileriosis, R. Spooner and Campbell, J. (eds): Antalya, Turkey.

**Oura CA, Bishop R, Wampande EM, Lubega GW, Tait A** (2004) *The persistence of component Theileria parva stocks in cattle immunized with the 'Muguga cocktail' live vaccine against East Coast fever in Uganda*. Parasitology, 129: 27-42.

**Oura CA, Odongo DO, Lubega GW, Spooner PR, Tait A, Bishop RP** (2003) *A panel of microsatellite and minisatellite markers for the characterisation of field isolates of Theileria parva*. International Journal of Parasitology, 33: 1641-1653.

**Ottenhoff TMH and Bevan MJ** (2004) *Host–pathogen interactions*. Current Opinion in Immunology, 16:439–442.

**Pain A, Renauld H, Berriman M, Murphy L, Yeats CA, Weir W, Kerhornou A, Aslett M, Bishop R, Bouchier C, Cochet M, Coulson RM, Cronin A, de Villiers EP, Fraser A, Fosker N, Gardner M, Goble A, Griffiths-Jones S, Harris DE, Katzer F, Larke N, Lord A, Maser P, McKellar S, Mooney P, Morton F, Nene V, O'Neil S, Price C, Quail MA, Rabinowitsch E, Rawlings ND, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Shah T, Squares R, Squares S, Tivey A, Walker AR, Woodward J, Dobbelaere DA, Langsley G, Rajandream MA, McKeever D, Shiels B, Tait A, Barrell B, Hall N** (2005) *Genome of the host-cell transforming parasite Theileria annulata compared with T. parva*. Science, 309: 131-133.

**Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K** (2008) *Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases*. Reviews in Medical Virology, 18: 407-421.

**Pipano E and Cahana M** (1969) *Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of Theileria annulata*. Journal of Parasitology 55: 765.

**Pipano E, Weishman Y, Benado A** (1974) *The virulence of four local strains of Theileria annulata*. Refuah Veterinarith, 23: 186-194.

**Pipano E** (1976) *Control of bovine theileriosis and anaplasmosis in Israel*. Bulletin de l'Office International des Epizooties, 86: 55-59.

**Pipano E** (1977) *Basic principles of Theileria annulata control*. In Theileriosis: Report of a Workshop Held in Nairobi, Kenya, 7-9 December, 1976, J. B. Henson and M. Campbell (eds) pp. 55-65. IDRC: Ottawa.

**Pipano E, Samish M, Kriegel Y, Yeruham I** (1981) *Immunization of Friesian cattle against Theileria annulata by the infection-treatment method*, The British Veterinary Journal, 137: 416-420.

**Pipano E** (1994) *Theileria annulata theileriosis, in Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. Oxford University: Cape Down.

**Pipano E** (1997) *Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance*. Tropical Animal Health and Production, 29: 86S-90S.

**Pipano E, Shkap V** (2000) *Vaccination against tropical theileriosis*. Annals of New York Academy of Science, 916: 484-500.

**Pipano E, Shkap V** (2006) *Theileria annulata infection, in Infectious Diseases of Livestock, ed. Coetzer JAW and Tustin RC*. Oxford University Press, Oxford, 486-497.

**Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Arico B, Comanducci M, Jennings GT, Baldi L, Bartolini E, Capecchi B, Galeotti CL, Luzzi E, Manetti R, Marchetti E, Mora M, Nuti S, Ratti G, Santini L, Savino S, Scarselli M, Storni E, Zuo P, Broeker M, Hundt E, Knapp B, Blair E, Mason T, Tettelin H, Hood DW, Jeffries AC, Saunders NJ, Granoff DM, Venter JC, Moxon ER, Grandi G, Rappuoli R** (2000) *Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing*. Science, 287: 1816-1820.

**Plutzer J and Karanis P** (2009) *Rapid identification of Giardia duodenalis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from faecal and environmental samples and comparative findings by PCR and real-time PCR methods*. Parasitology Research, DOI 10.1007/s00436-009-1391-3.

**Prasanth, C.S., Jagannath, M.S., Rajasekhar, M. and Rahman, S.A.** (1995) *Transfer and persistence of maternal antibodies against Theileria annulata in calves*. Indian Journal of Animal Sciences, 65: 492-496.

**Preston PM, Brown CG, Spooner RL** (1983) *Cell-mediated cytotoxicity in Theileria annulata infection of cattle with evidence for BoLA restriction*. Clinical Experimental Immunology, 53: 88-100

**Preston PM, Brown CG** (1985) *Inhibition of lymphocyte invasion by sporozoites and the transformation of trophozoite infected lymphocytes in vitro by serum from Theileria annulata immune cattle*. Parasite Immunology, 7: 301-314.

**Preston PM, Brown CG** (1988) *Macrophage-mediated cytostasis and lymphocyte cytotoxicity in cattle immunized with Theileria annulata sporozoites or macroschizont-infected cell lines*. Parasite Immunology, 10: 631-647.

**Preston PM, Brown CG, Bell-Sakyi L, Richardson W, Sanderson A** (1992a) *Tropical theileriosis in Bos taurus and Bos taurus cross Bos indicus calves: response to infection with graded doses of sporozoites of Theileria annulata*. Research in Veterinary Science, 53: 230-243.

**Preston PM, Brown CG, Richardson W** (1992b) *Cytokines inhibit the development of trophozoite-infected cells of Theileria annulata and Theileria parva but enhance the proliferation of macroschizont-infected cell lines*. Parasite Immunology, 14: 125-141.

**Preston PM, Brown CG, Entrican G, Richardson W, Boid R** (1993) *Synthesis of tumour necrosis factor-alpha and interferons by mononuclear cells from Theileria annulata-infected cattle*. Parasite Immunology, 15: 525-534.

**Preston PM and Jongejan F** (1999) *Protective Immune Mechanisms to Ticks and Tick-borne Diseases of Ruminants*. Parasitology Today, 15(7).

**Preston PM, Jackson LA, Sutherland IA, BellSakyi L, Wilkie G, Brown DJ, Schofield J, Melrose TR, Sanderson A and Brown CGD** (1998) *Theileria annulata: The expression of two novel macroschizont antigens on the surface of infected mononuclear cells differs during in vitro attenuation of a virulent cell line*. Experimental Parasitology, 89: 228-240.

**Preston PM, Hall FR, Glass EJ, Campbell JD, Darghouth MA, Ahmed JS, Shiels BR, Spooner RL, Jongejan F, Brown CG** (1999) *Innate and adaptive immune responses cooperate to protect cattle against Theileria annulata*. Parasitology Today, 15: 268-274

**Purnell RE** (1978) *Theileria annulata as a hazard to cattle in countries in the northern Mediterranean littoral*. Veterinary Sciences Communications, 2: 3-10.

**Rafyi A, Maghami G, Houshmand P** (1965) *On the virulence of Theileria annulata (Dschunkowsky and Luhs, 1904) and the premunition against bovine theileriasis in Iran*, Bulletin Of International Epizootiology, 64: 431-446.

**Ramzy RMR, Faris R, Bahgat M, Helmy H, Franklin C and Mckerrow H** (1997) *Evaluation of a stage-specific proteolytic enzyme of Schistosoma mansoni as marker of exposure*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 56: 668-673.

**Ranson H, Collins F and Hemingway J** (1998) *The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within the Anopheles gambiae class I glutathione S-transferase family*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95: 14284-14289.

**Rathore D, McCutchan TF** (2000) *The cytotoxic T lymphocyte epitope of the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein also modulates the efficiency of receptor\_ligand interaction with hepatocytes*. Infection and Immunity, 68:740\_3.

**Reddy PMT, Jagannath MS and Rajasekhar M** (1994) *Assay of Theileria annulata antibodies in vaccinated cattle by avidin-biotin ELISA*. Indian Veterinary Journal, 71: 763-767.

**Reitmaier R** (2007) *Review of immunoinformatic approaches to in-silico B-cell epitope prediction*. Nature Precedings, <<http://dx.doi.org/10.1038/npre.2007.353.1>>.

**Renneker S, Kullmann B, Gerber S, Dobschanski J, Bakheit MA, Geysen D, Shiels B, Tait A, Ahmed JS and Seitzer U** (2008) *Development of a Competitive ELISA for Detection of Theileria annulata*. Infection Transboundary and Emerging Diseases, 55: 249–256.

**Richardson JO, Forsyth LM, Brown CG, Preston PM** (1998) *Nitric oxide causes the macroschizonts of Theileria annulata to disappear and host cells to become apoptotic*. Veterinary Research Communications, 22: 31-45.

**Rithidech KN, Dunn JJ, Gordon CR** (1997) *Combining multiplex and touch down PCR to screen murine microsatellite polymorphisms*. Bio-Techniques, 23:36–45.

**Robert L, Jacob MP, Fulop T, Timar J, Hornebeck W** (1989) *Elastonectin and the elastin receptor*. Pathology-Biology, 37: 736-741.

**Robinson PM** (1982) *Theileria annulata and its transmission - A review*. Tropical Animal Health and Production, 14: 3-12.

**Rogers RJ, Dimmock CK, de Vos AJ, Rodwell BJ** (1988) *Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced in vivo against bovine babesiosis and anaplasmosis*. Australian Veterinary Journal, 65: 285-287.

**Roitt I** (1994) *Essential Immunology*. 8th edition, Blackwell Scientific Publications: Oxford.

**Ross BC, Czajkowski L, Hocking D, Margetts M, Webb E, Rothel L, Patterson M, Agius C, Camuglia S, Reynolds E, Littlejohn T, Gaeta B, Ng A, Kuczek ES, Mattick JS, Gearing D, Barr IG** (2001) *Identification of vaccine candidate antigens from a genomic analysis of Porphyromonas gingivalis*. Vaccine, 19: 4135-4142.

**Russomando G, Figueredo A, Almiron M, Sakamoto M, Morita K** (1992) *Polymerase chain reaction-based detection of Trypanosoma cruzi DNA in serum*. Journal of Clinical Microbiology, 30: 2864-2868.

**Sager H, Bertoni G, Jungi TW** (1998) *Differences between B cell and macrophage transformation by the bovine parasite, Theileria annulata: a clonal approach*. Journal of Immunology, 161: 335-341.

**Sager H, Davis WC, Dobbelaere DA, Jungi TW** (1997) *Macrophage-parasite relationship in theileriosis. Reversible phenotypic and functional dedifferentiation of macrophages infected with Theileria annulata*. Journal of Leukocyte Biology, 61: 459-468.

**Sako Y, Asada M, Kubota S, Sugimoto C, Onuma M** (1999) *Molecular cloning and characterisation of 23-kDa piroplasm surface proteins of Theileria sergenti and Theileria buffeli*. International Journal of Parasitology, 29(4):593-9.

**Salem GH, Liu X, Johnsrude JD, Dame JB, Roman RG (1999)** *Development and evaluation of an extra chromosomal DNA-based PCR test for diagnosing bovine babesiosis.* Molecular Cell Probes, 13: 107-113.

**Salih DA, Abdel Rahman MB, Mohammed AS, Ahmed R, Kamal S, El Hussein AM (2009)** *Seroprevalence of tick-borne diseases among cattle in the Sudan.* Parasitology Research, 104(4):845-50.

**Salih D A, Ahmed JS, Bakheit MA, Ali EB, El Hussein AM, Hassan SM, Shariff OE, Fadl M and Jongejan F (2005a)** *Validation of the indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Theileria annulata infection in cattle.* Parasitology Research, 97: 302–308.

**Salih D A, Hassan S, Bakheit MA, El Hussein AM, Jongejan F and Ahmed JS (2005b)** *Application of the indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Theileria annulata infection in cattle.* Proceedings 5th International Conference on Ticks and Tick-Borne Pathogens, Neuchâtel, Switzerland, 163–166.

**Salih D A, Hassan SM and El Hussein AM (2007)** *Comparisons among two serological tests and microscopic examination for the detection of Theileria annulata in cattle in northern Sudan.* Preventive Veterinary Medicine, 81: 323–326.

**Salih DA, Liu Z, Bakheit MA, Ali AM, El Hussein AM, Unger H, Viljoen G, Seitzer U, Ahmed JS (2008)** *Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of tropical theileriosis.* Transboundries of Emerging Diseases, 55: 238-243.

**Samish M (1977)** *Infective Theileria annulata in the tick without a blood meal stimulus.* Nature, 270: 51-52.

**Sayin F, Dincer S, Karaer Z, Cakmak A, Inci A, Yukari BA, Eren H, Vatansver Z, Nalbantoglu S (2003)** *Studies on the epidemiology of tropical theileriosis (Theileria annulata infection) in cattle in Central Anatolia Turkey.* Tropical Animal Health and Production, 35: 521-539.

**Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H, Nalbantoğlu S, Vatansver Z (2000)** *Türkiye’de tropikal theileriosis üzerine araştırmalar.* Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 42 (1): 1-11.

**Schein E (1975)** *On the life cycle of Theileria annulata (Dschunkowsky and Luhs, 1904) in the midgut and hemolymph of Hyalomma anatolicum excavatum (Koch, 1844).* Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin,Almanya), 47: 165-167.

**Schein E, Buscher G, Friedhoff KT (1975)** *Light microscopic studies on the development of Theileria annulata (Dschunkowsky and Luhs, 1904) in Hyalomma anatolicum excavatum (Koch, 1844). I. The development in the gut of engorged nymphs (author's transl).* Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin,Almanya), 48: 123-136.

**Schein E, Friedhoff KT** (1978) *Light microscopic studies on the development of Theileria annulata (Dschunkowsky and Luhs, 1904) in Hyalomma anatolicum excavatum (Koch, 1844). II. The development in haemolymph and salivary glands* (author's transl). *Zeitschrift für Parasitenkunde* (Berlin,Almanya), 56: 287-303.

**Schein E and Voigt WP** (1979) *Chemotherapy of bovine theileriosis with halofuginone*. *Acta Tropica*, 36: 391-394.

**Schettlers, TP, Kleuskens J, Scholtes NC, Gorenflot A** (1998) *Parasite localization and dissemination in the Babesia infected host*. *Annals of Tropical Medical Parasitology*, 92: 513–519.

**Schmuckli-Maurer J, Casanova C, Schmied S, Affentranger S, Parvanova I, Kang'a S, Nene V, Katzer F, McKeever D, Muller J, Bishop R, Pain A, Dobbelaere DA** (2009) *Expression analysis of the Theileria parva subtelomere-encoded variable secreted protein gene family*. *PLoS.One.*, 4: e4839.

**Schneider I., Haller D, Seitzer U, Beyer D and Ahmed JS** (2004) *Molecular genetic characterization and subcellular localization of a putative Theileria annulata membrane protein*. *Parasitology Research*, 94: 405–415.

**Schneider I, Haller D, Kullmann B, Beyer D, Ahmed JS, Seitzer U** (2007) *Identification, molecular characterization and subcellular localization of a Theileria annulata parasite protein secreted into the host cell cytoplasm*. *Parasitology Research*, 101: 1471-1482.

**Schnittger L, Shayan P, Biermann R, Mehlhorn H, Gerdes J, Ahmed JS** (2000) *Molecular genetic characterization and subcellular localization of Theileria annulata mitochondrial heat-shock protein 70*. *Parasitology Research*, 86: 444–452.

**Schnittger L, Katzer F, Biermann R, Shayan P, Boguslawski K, McKellar S, Beyer D, Shiels BR, Ahmed JS** (2002) *Characterization of a polymorphic Theileria annulata surface protein (TaSP) closely related to PIM of Theileria parva: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120: 247-256.

**Seitzer U, Bakheit MA, Salih DE, Ali A, Haller D, Yin H, Schnittger L and Ahmed JS** (2007) *From molecule to diagnostic tool: Theileria annulata surface protein TaSP*. *Parasitology Research*, 101: S217–S223.

**Seitzer U, Ahmed J** (2008) *Tropical theileriosis: cytotoxic T lymphocyte response to vaccination*. *Vaccine*, 26 Suppl 6: G24-G28.

**Sergent, E., Donatien, A.L., Parrot, L.M. and Lestoquard, F.** (1945). *Etudes sur les piroplasmoses bovines*. *Institute Pasteur d'Algeria: Alger*.

**Sergent E, Donatien AL, Parrot LM and Lestoquard F** (1928) *Transmission de la piroplasmose bovine a Theileria dispar, de l'Afrique du Nord, par la tique Hyalomma mauritanicum*. *Compte Rendue de l'Academie des Sciences*, 187: 259-260.



**Shapiro SZ, Fujisaki K, Morzaria SP, Webster P, Fujinaga T, Spooner PR, Irvin AD** (1987) *A life-cycle stage-specific antigen of Theileria parva recognized by anti-macroschizont monoclonal antibodies*. Parasitology, 94 ( Pt 1): 29-37.

**Sharma RD and Brown CGD** (1981) *In vitro studies on two strains of Theileria annulata*. In Advances in the Control of Theileriosis, A. D. Irvin, M. P. Cunningham and Young, A.S. (eds) pp. 140-142. Martinus Nijhoff: The Hague.

**Shaw MK, Tilney LG, Musoke AJ** (1991) *The entry of Theileria parva sporozoites into bovine lymphocytes: evidence for MHC class I involvement*. Journal of Cell Biology, 113: 87-101.

**Shaw MK, Tilney LG** (1992) *How individual cells develop from a syncytium: merogony in Theileria parva (Apicomplexa)*. Journal of Cell Science, 101(Pt 1): 109-123.

**Shaw MK** (1997) *The same but different: the biology of Theileria sporozoite entry into bovine cells*. International Journal of Parasitology, 27: 457-474.

**Shaw MK** (2003) *Cell invasion by Theileria sporozoites*. Trends in Parasitology, 19: 2-6.

**Shayan P, Ahmed JS** (1997) *Theileria-mediated constitutive expression of the casein kinase II-alpha subunit in bovine lymphoblastoid cells*. Parasitology Research, 83: 526-532.

**Shayan P, Biermann R, Schein E, Gerdes J, Ahmed JS** (1998) *Detection and differentiation of Theileria annulata and Theileria parva using macroschizont-derived DNA probes*. Annals of New York Academy of Science USA, 849: 88-95.

**Shayan P, Rahbari S** (2005) *Simultaneous differentiation between Theileria spp. and Babesia spp. on stained blood smear using PCR*. Parasitology Research, 97, 281-286.

**Shiels B, McDougall C, Tait A, Brown CG** (1986) *Antigenic diversity of Theileria annulata macroschizonts*. Veterinary Parasitology, 21: 1-10.

**Shiels B, Hall R, Glascodine J, McDougall C, Harrison C, Taracha E, Brown D, Tait A** (1989) *Characterization of surface polypeptides on different life-cycle stages of Theileria annulata*. Molecular and Biochemical Parasitology, 34: 209-220.

**Shiels B, Symth A, Dickson J, McKellar S, Tetley L, Fujisaki K, Hutchinson B and Kinnaird JH** (1994) *A stoichiometric model of stage differentiation in the protozoan parasite Theileria annulata*. Molecular and Cellular Differentiation, 2: 101-125.

**Shiels BR** (1999) *Should I stay or should I go now? A stochastic model of stage differentiation in Theileria annulata*. ParasitologyToday, 15: 241-245.

**Shiels BR, d'Oliveira C, McKellar S, Ben Miled L, Kawazu S, Hide G** (1995) *Selection of diversity at putative glycosylation sites in the immunodominant merozoite/piroplasm surface antigen of Theileria parasites*. Molecular and Biochemical Parasitology, 72: 149-162.

- Shiels BR, McKellar S, Katzer F, Lyons K, Kinnaird J, Ward C, Wastling JM, Swan D** (2004) *A Theileria annulata DNA binding protein localized to the host cell nucleus alters the phenotype of a bovine macrophage cell line*. Eukaryotic Cell, 3: 495-505.
- Shuber AP, Skoletsky J, Stern R, Handelin BL** (1993) *Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis*. Human Molecular Genetics, 2:153–158.
- Singh DK, Jagdish S, Gautam OP, Dhar S** (1979) *Infectivity of ground-up tick supernates prepared from Theileria annulata infected Hyalomma anatolicum anatolicum*. Tropical Animal Health and Production, 11: 87-90.
- Singh DK, Thakur M, Raghav PR, Varshney BC** (1993) *Chemotherapeutic trials with four drugs in crossbred calves experimentally infected with Theileria annulata*. Research in Veterinary Science, 54: 68-71.
- Somerville RP, Littlebury P, Pipano E, Brown CG, Shkap V, Adamson RE, Oliver RA, Glass EJ, Hall FR** (1998b) *Phenotypic and genotypic alterations associated with the attenuation of a Theileria annulata vaccine cell line from Turkey*. Vaccine, 16: 569-575.
- Suarez CE, White O, Wortman JR, Knowles DP Jr, McElwain TF, Nene VM** (2007) *Genome Sequence of Babesia bovis and Comparative Analysis of Apicomplexan Hemoprotezoa*. PLoS Pathogens, 3(10): e148. doi:10.1371/journal.ppat.0030148.
- Spooner RL, Innes EA, Glass EJ, Brown CG** (1989) *Theileria annulata and T. parva infect and transform different bovine mononuclear cells*. Immunology, 66: 284-288.
- Spooner RL and Brown CGD** (1991) *Theileriosis and evidence for genetic resistance*. In Breeding for Disease Resistance in Farm Animals, Owen, J.B. and Axford, R.F.E. (eds) 235-243. CAB International: Wallingford, UK.
- Stagg DA, Brown CG, Crawford JG, Kanhai GK, Young AS** (1974) *In vitro cultivation of Theileria lawrencei-infected lymphoblastoid cell lines derived from a buffalo (Syncerus caffer)*. Research in Veterinary Science, 16: 125-127.
- Sugimoto C, Kawazu S, Kamio T, Fujisaki K** (1991) *Protein analysis of Theileria sergenti/buffeli/orientalis piroplasms by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*. Parasitology, 102 (Pt 3): 341-346.
- Sutherland IA, Shiels BR, Jackson L, Brown DJ, Brown CG, Preston PM** (1996) *Theileria annulata: altered gene expression and clonal selection during continuous in vitro culture*. Experimental Parasitology, 83: 125-133.
- Sundar N, Balasundaram S, Ramadass P and Anandan R** (1993) *Usefulness of enzyme-linked-immunosorbent assay for the diagnosis of Theileria annulata infection*. Indian Journal of Animal Sciences, 63. 1219-1221.

**Swan DG, Stadler L, Okan E, Hoffs M, Katzer F, Kinnaird J, McKellar S, Shiels BR** (2003) *TashHN*, a *Theileria annulata* encoded protein transported to the host nucleus displays an association with attenuation of parasite differentiation. *Cell Microbiology*, 5: 947-956.

**Swan DG, Stern R, McKellar S, Phillips K, Oura CA, Karagenc TI, Stadler L, Shiels BR** (2001) *Characterisation of a cluster of genes encoding Theileria annulata AT hook DNA-binding proteins and evidence for localisation to the host cell nucleus*. *Journal of Cell Science*, 114: 2747-2754.

**Tait A, Hall FR** (1990) *Theileria annulata: control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines*. *Revue Scientifique Technique (International office of Epizootics)*, 9: 387-403.

**Tanaka M, Onoe S, Matsuba T, Katayama S, Yamanaka M, Yonemichi H, Hiramatsu K, Baek BK, Sugimoto C, Onuma M** (1993) *Detection of Theileria sergenti infection in cattle by polymerase chain reaction amplification of parasite-specific DNA*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(10):2565-9.

**Taracha EL, Goddeeris BM, Teale AJ, Kemp SJ, Morrison WI** (1995) *Parasite strain specificity of bovine cytotoxic T cell responses to Theileria parva is determined primarily by immunodominance*. *Journal of Immunology*, 155: 4854-4860.

**Teng G and Papavasiliou FN** (2007). *Immunoglobulin Somatic Hypermutation*. *Annual Review of Genetics*, 41: 107–120. ;Roskos L., Klakamp S., Liang M., Arends R., Green L. (2007). Stefan Dübel. ed. *Handbook of Therapeutic Antibodies*. Weinheim: Wiley-VCH. 145-169.

**Thekiso OM, Bazie RS, Coronel-Servian AM, Sugimoto C, Kawazu S and Inoue N** (2009a) *Stability of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Reagents and its Amplification Efficiency on Crude Trypanosome DNA Templates*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(4): 471–475.

**Thekiso OM, Rambritch RE, Nakao R, Bazie RS, Mbatia P, Namangala B, Malele I, Skilton RA, Jongejan F, Sugimoto C, Kawazua SI, Inoue N** (2009b) *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection of Theileria parva infections targeting the PIM and p150 genes*. *International Journal for Parasitology*, article in press.

**Theiler, A.** (1904). *Rhodesian tick fever*. *Transvaal Agricultural Journal*, 2: 421-438.

**Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG** (1997) *The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882.

**Tisdell CA, Harrison SR ve Ramsay GC** (1999) *The economic impacts of endemic diseases and disease control programmes*. *Revue Scientifique Technique (International office of Epizootics)*, 18: 380-398.

**Tomita N, Mori Y, Kanda H and Notomi T** (2008) *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products*. *Nature protocols*, 3 no: 5 877.

- Toye P, Gобрight E, Nyanjui J, Nene V, Bishop R** (1995a) *Structure and sequence variation of the genes encoding the polymorphic, immunodominant molecule (PIM), an antigen of Theileria parva recognized by inhibitory monoclonal antibodies*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 73: 165-177.
- Toye P, Nyanjui J, Goddeeris B, Musoke AJ** (1996) *Identification of neutralization and diagnostic epitopes on PIM, the polymorphic immunodominant molecule of Theileria parva*. *Infection and Immunity*, 64: 1832-1838.
- Toye P, Wijngaard P, MacHugh N, Clevers H** (1995b) *An assay for the identification of antigens recognized by cytotoxic T cells, based on transient transfection of COS cells*. *Journal of Immunological Methods*, 187: 95-101.
- Toye PG, Goddeeris BM, Iams K, Musoke AJ, Morrison WI** (1991) *Characterization of a polymorphic immunodominant molecule in sporozoites and schizonts of Theileria parva*. *Parasite Immunology*, 13: 49-62.
- Toye PG, Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Nene V, Iams K, Roose J, Nyanjui JK, Gобрight E, Musoke AJ, Clevers HC** (1995c) *Characterization of the gene encoding the polymorphic immunodominant molecule, a neutralizing antigen of Theileria parva*, *J.Immunol.* 155: 1370-1381.
- Tsur I, Pipano E** (1966) *Attenuation of virulence of strains of Theileria annulata by growth and passage through tissue culture*. *Journal of Protozoology*, 13: 33-34.
- Turner AJ** (1994) *PIG-tailed membrane proteins*. *Essays in Biochemistry*, 28: 113-127.
- Uchida TA, Yanagawa H, Mori T, Shiraishi S** (1985) *Ultrastructural observations of the intra-erythrocytic merozoite in Theileria sergenti*. *Tropical Medicine and Parasitology*, 36: 35-38.
- Uilenberg G** (1981) *Theilerial species of domestic livestock, in Advances in the Control of Theileriosis*. ed. Irvin AD, Cunningham MP, and Young AS, Martinus Nijhoff, The Hague p 4-37.
- Van Regenmortel MHV** (2006) *Immunoinformatics may lead to a reappraisal of the nature of the B cell epitopes and the feasibility of synthetic peptide vaccines*. *Journal of Molecular Recognition*, 19: 183 – 187.
- Venkatesan P and Wakelin D** (1993) *ELISAs for Parasitologists: or Lies, Dammed Lies and ELISAs*. *Parasitology Today*, 9: 228-2.
- Visser AE, Abraham A, Sakyi LJ, Brown CG, Preston PM** (1995) *Nitric oxide inhibits establishment of macroschizont-infected cell lines and is produced by macrophages of calves undergoing bovine tropical theileriosis or East Coast fever*. *Parasite Immunology*, 17: 91-102.
- Vizard AL, Anderson GA and Gasser RB** (1990) *Determination of the optimum cut-off value of a diagnostic test*. *Preventive Veterinary Medicine*, 10: 137-143..

**Voet D, Voet JG, Pratt CW** (2006) *Fundamentals of Biochemistry*. John Wiley and Sons Inc.

**Voller A, Barlett A and Bidwell DE** (1976) *Enzyme immunoassays for parasitic diseases*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 70: 98-106.

**Weir W** (2006) *Genomic and population genetic studies on Theileria annulata*. Doktora tezi, University of Glasgow.

**Weir W, Ben Miled L, Karagenc T, Katzer F, Darghouth M, Shiels B, Tait A** (2007) *Genetic exchange and sub-structuring in Theileria annulata populations*. Molecular and Biochemical Parasitology, 154: 170-180.

**Wendy C B, Junzo N, Knowles DP, Goff WL** (2006) *Immune control of Babesia bovis infection*. Veterinary Parasitology, 138; 75–87.

**Wiesner RJ, Ruegg JC, Morano I** (1992) *Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 183: 553-559.

**Wilkie GM, Brown CG, Kirvar BE, Thomas M, Williamson SM, Bell-Sakyi LJ, Sparagano O** (1998) *Chemoprophylaxis of Theileria annulata and Theileria parva infections of calves with buparvaquone*. Veterinary Parasitology, 78: 1-12.

**Williamson SM** (1988) *A Theileria annulata sporozoite surface antigen as a potential vaccine for tropical theileriosis*. Doktora tezi, University of Edinburgh: Edinburgh.

**Williamson S, Tait A, Brown D, Walker A, Beck P, Shiels B, Fletcher J, Hall R** (1989) *Theileria annulata sporozoite surface antigen expressed in Escherichia coli elicits neutralizing antibody*. Proceedings of National Academy of Science USA, 86: 4639-4643.

**Williamson S, Matita G, Ilhan T, Knight P, McDonald F, Shiels B and Boulter N** (1994) *Sporozoite and piroplasm recombinants: Their potential for use in diagnostic ELISAs*. In Third European Union Coordination Meeting on Tropical Theileriosis: Antalya, Turkey.

**Wizemann TM, Heinrichs JH, Adamou JE, Erwin AL, Kunsch C, Choi GH, Barash SC, Rosen CA, Masure HR, Tuomanen E, Gayle A, Brewah YA, Walsh W, Barren P, Lathigra R, Hanson M, Langermann S, Johnson S, Koenig S** (2001) *Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against Streptococcus pneumoniae infection*. Infection and Immunity, 69: 1593-1598.

**Workman P** (2004) *Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone*. Trends in Molecular Medicine, 10: 47–51.

**Wright P** (1987) *Enzyme Immunoassay: Observations on aspect of quality control*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 17: 441-452.

**Wright PF, Nilsson, E., van Rouij, E.M.A., Lelenta, M. and Jeggo, M.H.** (1993). *Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis*. *Revue Scientific et Techniques* (International Office of Epizootics), 12: 435-450.

**Young AS, Mutugi JJ, Kariuki DP, Lampard D, Maritim AC, Ngumi PN, Linyonyi A, Leitch BL, Ndungu SG, Lesan AC** (1992) *Immunisation of cattle against theileriosis in Nakuru District of Kenya by infection and treatment and the introduction of unconventional tick control*. *Veterinary Parasitology*, 42: 225-240.

**Zablotskii VT** (1991) *Specific prevention of bovine theileriosis in the Soviet Union*. 9-10. Anand, India, National Dairy Development Board. Proceedings of the second EEC workshop on orientation and co-ordination of research on tropical theileriosis.

**Zarlenga DS, Chute MB, Gasbarre LC, Boyd PC** (2001) *A multiplex PCR assay for differentiating economically important gastrointestinal nematodes of cattle*. *Veterinary Parasitology*, 97: 199–209.

**Zavala F, Tam JP, Hollingdale MR, Cochrane AH, Quakyi I, Nussenzweig RS and Nussenzweig V** (1985) *Rationale for development of a synthetic vaccine against Plasmodium falciparum malaria*. *Science*, 228: 1436-1440.

**Zhang ZH** (1991) *Theileria annulata and its control in China*. 11-14. Anand, India, National Dairy Development Board. Proceedings of the second EEC workshop on orientation and co-ordination of research on tropical theileriosis.

**Zhuang WZ, Sugimoto C, Kubota S, Onoe S, Onuma M** (1995) *Antigenic alteration in major piroplasm surface proteins of Theileria sergenti during infection*. *Veterinary Parasitology*, 60: 191-198.

**Zimmermann KD, Schogl B, Plaimauer B, Manhalter JW** (1996) *Quantitative multiple competitive PCR of HIV-1 DNA in a single reaction tube*. *BioTechniques*, 21:480–484.

## TEŞEKKÜR

Bana her türlü desteği sağlayan baŐta eŐim ve ailem olmak üzere, doktora tezimin çalışmalarında ve hazırlanmasında bana her türlü imkanı veren Danışman Hocam Doç. Dr. Tülin KARAGENÇ ile Anabilim Dalı baŐkanı olan hocam Prof. Dr. Hasan EREN'e teşekkür ederim. Bunun yanında doktora çalıŐmalarım esnasında gerek hayvan deneyleri gerekse materyal sağlamada bana her türlü yardımı esirgemeyen Dr. Serkan BAKIRCI, Murat HOŐGÖR, Hakan SARALI, Gülcan PEKEL ile diğer tüm arkadaşlara desteklerinden ve gösterdikleri hoŐgörüden ötürü teşekkür ederim. Ayrıca tezimin yapılıŐında bana kendi laboratuvarlarında çalışma imkanı verip, her türlü materyalin sağlanmasında yardımcı olan ve yaptığım çalışmalarda bana yol gösteren Dr. William Wier, Dr. Jane Kinnard, Prof. Brian Sielts ile Prof. Andy Tait'e ayrıca teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Eskişehir’de doğdu. İlk öğrenimimi Eskişehir Cengiz Topel İlkokulunda, Orta ve lise öğrenimimi Eskişehir Kılıçoğlu Anadolu Lisesinde tamamladı. 1996 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakóltesi kazandı ve 2001 yılında mezun oldu. 2001 – 2002 yılları arasında Gazi Emir Ulaştırma Okul Komutanlığında askerlik görevini tamamladı. 2003 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Parazitoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladı.