T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

KARADENİZ BÖLGESİ'NDEKİ SIĞIRLARDAN ELDE EDİLEN *BABESIA BOVIS* SUŞLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Proje No: **TSD-08-346**

Proje Türü
Doktora Tezi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Abdullah İNCİ
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Araş. Gör. Önder DÜZLÜ
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Haziran 2010

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve çalışmalarımın her aşamasında her türlü bilgi birikimiyle bana her zaman yol gösteren, ilgi ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Abdullah İNCİ'ye, saha ve laboratuar çalışmalarında her türlü bilgi birikimlerinden yararlandığım Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM ve Doç. Dr. Anıl İÇA'ya, tez izleme komitesi üyesi Sayın Hocalarıma ve laboratuar çalışmalarında her zaman desteğini aldığım Biyolog Zuhal BİŞKİN'e teşekkürü borç bilirim. Diğer yandan bana bu günleri sağlayan ve hayatımın her evresinde maddi ve manevi desteklerini sürekli yanımda hissettiğim sevgili aileme şükranlarım ömür boyu sürecektir. Doktora tezimi maddi yönden destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve Avrupa Birliği 6. Çerçeve Programı kapsamında INCO-003691 kodlu bu çalışmayı destekleyen MEDLABAB proje ekibine, tez çalışmalarım esnasında çalışma sahasından materyal elde edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Veteriner Hekim meslektaşlarıma sonsuz teşekkürler.

KARADENİZ BÖLGESİ'NDEKİ SIĞIRLARDAN ELDE EDİLEN *BABESIA BOVIS* SUŞLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Bu çalışma, Karadeniz Bölgesi'ndeki sığırlardan elde edilen *Babesia bovis* izolatlarının *msa-2c* gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonunun ortaya konulması ve Dünya'daki diğer benzer suşlarla benzerliklerinin kıyaslanması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, 2008-2010 tarihleri arasında Karadeniz Bölgesi'ndeki 13 ilde bulunan, meraya çıkmış ve rastgele seçilmiş toplam 542 sığırdan kan örnekleri toplanmıştır. Laboratuarda bir yandan kan örneklerinden mikroskobik muayene için frotiler hazırlanırken bir yandan da kan örneklerinin ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen DNA'lar RLB testiyle *Babesia* ve *Theileria* türleri yönünden incelenmiştir. *Babesia bovis* olduğu tespit edilen 10 örneğin, *msa-2c* gen bölgesine göre moleküler karakterinin net olarak ortaya konulması amacıyla spesifik primerlerle PCR yapılmıştır. PCR sonucunda elde edilen yaklaşık 798 bp'lik spesifik bantlar jelden ekstrakte edilerek sekansa gönderilmiştir. Sekans sonuçlarına göre 10 örneğin nükleotid dizilimleri ortaya konulmuş ve Dünya'daki diğer benzer suşlarla identiklik dereceleri kıyaslanmıştır. *Babesia bovis* izolatları GenBank'a kaydettirilerek aksesyon numaraları alınmıştır.

Karadeniz Bölgesi'ndeki sığırlardan toplanan kan örneklerinin mikroskobik incelemesinde babesiosis'in %1,7, theileriosis'in ise %9,2 oranında yaygınlık gösterdiği tespit edilmiştir. RLB sonuçlarına göre, Karadeniz Bölgesi'nde *B. bovis*'in %1,8, *B. bigemina*'nın %2,2, *T. annulata*'nın %2, *T. buffeli/orientalis*'in de %20,6 oranlarında prevalansa sahip olduğu ortaya konmuştur. GenBank'a kayıtları yapılan *B. bovis* izolatlarının *msa-2c* gen bölgesine göre kendi aralarındaki identiklik oranının %94-99, Dünya'daki benzer suşlarla yakınlık derecelerinin ise % 89-99 arasında değiştiği saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma ile, Türkiye'de ilk defa *B. bovis*'in *msa-2c* gen bölgesinin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Bu çalışma sonucunun, gelecekte Türkiye'ye özgü suşlarla yapılacak aşı çalışmalarına temel teşkil edeceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Babesia bovis*, Karadeniz Bölgesi, moleküler karakterizasyon, *msa-2c*, sığır

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *BABESIA BOVIS* ISOLATES COLLECTED FROM CATTLE IN BLACK SEA REGION

ABSTRACT

This study was carried out to exhibit the molecular characterization of *msa-2c* gene region of *Babesia bovis* isolates collected from the cattle in Black Sea Region and to compare the similarity with the other similar isolates in the world. For this aim, the blood samples were collected from totally 542 cattle which were gone to pasture and selected randomly in different periods between 2008-2010 in 13 provinces of Black Sea Region in Turkey. While the blood smears were being prepared from the blood samples in the laboratory, the samples were extracted and the DNA was investigated for *Babesia* and *Theileria* species by RLB at the same time. PCR of 10 samples which were detected as *B. bovis* was performed with specific primers to exhibit the molecular characterization of *msa-2c* gene region. Approximately 798 bp bands obtained with PCR were extracted from the gel and sent for the sequencing. According to the sequence results, nucleotide sequences of 10 samples were exhibited and compared the similarity with other similar isolates in the world. *Babesia bovis* isolates were deposited to GenBank and the accession numbers were taken.

In the microscopic examination of the blood samples collected from the cattle in Black Sea Region, the prevalence of babesiosis and theileriosis was determined as 1.7% and 9.2%, respectively. According to RLB results, the prevalence of *B. bovis*, *B. bigemina*, *T. annulata* and *T. buffeli/orientalis* was detected as 1.8%, 2.2%, 2% and 20.6%, respectively. It was also established that the similarity of *B. bovis* isolates deposited to GenBank varied between 94-99% in each other and between 89-99% in the other similar isolates in the world.

As a result, it was firstly characterized of *msa-2c* gene region of *B. bovis* with molecular methods in Turkey. It is thought that the results of this study will provide a basis for the vaccination studies with the characteristic Turkey isolates.

Keywords: *Babesia bovis*, Black Sea Region, molecular characterization, *msa-2c*, cattle

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

TEŞEKKÜR 3
ÖZET 4
ABSTRACT 5
İÇİNDEKİLER 6
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ..... 10
1. GİRİŞ VE AMAÇ 12
2. GENEL BİLGİLER 15
2.1. BABESIOSIS'İN TANIMI VE TARİHÇESİ 15
2.2. *BABESIA* TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ 17
2.3. *BABESIA* TÜRLERİNİN HAYAT SİKLUSU 18
2.3.1. Omurgalı Konakta Gelişme 19
2.3.2. Vektör Kenede Gelişim 19
2.4. SIĞIRLARDAKİ *BABESIA* TÜRLERİ 22
2.4.1. *Babesia bigemina* (Smith ve Kilborne, 1893) 22
2.4.1.1. Yayılış ve Epidemiyoloji 22
2.4.1.2. Gelişme 24
2.4.1.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler..... 24
2.4.2. *Babesia bovis* (Babes 1888, Starcovici, 1893) 26
2.4.2.1. Yayılış ve Epidemiyoloji 26
2.4.2.2. Gelişme 27
2.4.2.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler..... 27
2.4.2.4. Zoonotik Önemi 28
2.4.3. *Babesia divergens* (M'Fadyean and Stockman, 1911)..... 28
2.4.3.1. Yayılış ve Epidemiyoloji 28
2.4.3.2. Gelişme 28
2.4.3.3. Zoonotik Önemi 29

Sayfa no

2.4.4. *Babesia major* (Sergent, Donatien, Parroti Lestoquard and Plantureux, 1926) 29
2.4.4.1. Yayılış ve Epidemiyoloji 29
2.4.4.2. Gelişme 29
2.4.4.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler..... 29
2.4.5. *Babesia jakimovi* 29
2.4.6. *Babesia occultans*..... 29
2.4.7. *Babesia ovate* 30
2.5. *BABESIA* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER BİYOLOJİK MEKANİZMALARI VE YAPILARI 30
2.5.1. Eritrositlere Giriş Mekanizması 30
2.5.2. Eritrositlere Girişin Engellenme Mekanizması 33
2.5.3. Antijenik Farklılık 34
2.5.4. Babesiosis'te Bağışıklık..... 35
2.5.4.1. Kazanılmış Bağışıklık..... 36
2.5.4.1.1. Humoral İmmun Yanıt 36
2.5.4.1.2. Hücresel İmmun Yanıt 37
2.5.4.2. Doğal Bağışıklık (Nonspesifik İmmun Yanıt) 38
2.5.5. *Babesia bovis*'in Genomik Yapısı..... 39
2.5.6. *Babesia bovis*'in Transkripsiyon Mekanizması 43
2.5.7. *Babesia bovis*'in Metabolik Özellikleri 47
2.5.7.1. Karbonhidrat Metabolizması 48
2.5.7.1.1. Glikoliz 48
2.5.7.1.2. Mitokondri 49
2.5.7.1.3. Trikarboksilik Asit (TCA) Siklusu..... 50
2.5.7.1.4. Oksidatif Fosforilasyon ve Elektron Transpor Zinciri 50
2.5.7.1.5. Apicoplast 52
2.5.7.2. Protein ve Nükleik Asit Metabolizması 52
2.5.7.3. Lipid Metabolizması 54
2.5.7.4. *Babesia bovis*'te Bulunmayan Metabolik Yollar..... 54

Sayfa no

2.6. BABESIOSIS'TE TEŞHİS 55
2.6.1. Mikroskobik Muayene 55
2.6.2. Serolojik Testler 56
2.6.3. Moleküler Teknikler 57
2.7. BABESIOSIS'TE TEDAVİ 58
2.8. BABESIOSIS'TE KORUNMA VE KONTROL 61
2.8.1. Kene Kontrolü 61
2.8.2. Premunisyon 61
2.8.3. Aşılama 61
3. GEREÇ VE YÖNTEM 63
3.1. SAHA ÇALIŞMALARI 63
3.1.1. Hayvan Materyali (Sığırlar) 63
3.1.2. Kan Örnekleri 63
3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI 65
3.2.1. Mikroskobik İnceleme 65
3.2.2. DNA Ekstraksiyonu 66
3.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR) 68
3.2.4. PCR Ürünlerinin Elektroforez ile Görüntülenmesi 70
3.2.5. Reverse Line Blotting (RLB) 71
3.2.5.1. RLB Problarının Seçimi 71
3.2.5.2. RLB Membranın Hazırlanması 72
3.2.5.3. RLB Hibridizasyonu 73
3.2.5.4. Membranın Temizlenmesi ve Muhafazası 74
3.2.5.5. RLB'de Kullanılan Solusyonların Hazırlanması 74
3.2.6. Nested-PCR 75
3.2.7. *Babesia bovis*'e Ait *msa-2c* Gen Primerleri ile Yapılan PCR 76
3.2.8. Jelden Ekstraksiyon İşlemi 78
3.2.9. Sekans Analizleri 80
3.2.10. İstatistiksel Analiz 80

Sayfa no

4. BULGULAR 81
4.1. MİKROSKOBİK BULGULAR 81
4.2. PCR SONUÇLARI 83
4.3. RLB SONUÇLARI 83
4.4. RLB SONUÇLARINA GÖRE EPİDEMİYOLOJİK FAKTÖRLERİN ANALİZİ 86
4.5. NESTED-PCR SONUÇLARI 90
4.6. *BABESIA BOVIS*'E AİT *msa-2c* GEN PRİMERLERİ İLE YAPILAN PCR SONUÇLARI 91
4.7. SEKANS ANALİZİ SONUÇLARI 92
4.8. SEKANS ANALİZ SONUÇLARININ FİLOGENETİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ 99
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 110
6. KAYNAKLAR 119

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 2.1. Bazı apicomplexan protozoonların genomik karakterleri 43
Tablo 2.2. Türkiye'de sığırlarda babesiosis tedavisinde kullanılan ruhsatlı preparatlar..... 60
Tablo 3.1. Kan örneklerinin alındığı iller ve örneklerin dağılımı 64
Tablo 3.2. Karadeniz Bölgesi'nde incelenen sığırların yerleşim yerine, yaş, cinsiyet ve ırkına göre dağılımı 65
Tablo 3.3. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ticari Kitin İçeriği 66
Tablo 3.4. RLB testi amacıyla yapılan PCR'da kullanılan primerler 68
Tablo 3.5. PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları..... 69
Tablo 3.6. PCR'da amplifikasyon için gerekli şartlar..... 70
Tablo 3.7. RLB Problarının Sekans Dizilimleri 72
Tablo 3.8. Nested-PCR'da Kullanılan Primerler 75
Tablo 3.9. Nested-PCR'ın birinci ve ikinci PCR reaksiyonlarında kullanılan malzemeler ve miktarları..... 76
Tablo 3.10. Nested-PCR'da amplifikasyon için gerekli şartlar 76
Tablo 3.11. *msa-2c* primerleri ile uygulanan PCR'da kullanılan primerler..... 77
Tablo 3.12. *msa-2c* primerleri ile uygulanan PCR'da kullanılan malzemeler ve miktarları 77
Tablo 3.13. *msa-2c* primerleri ile uygulanan PCR'da amplifikasyon için gerekli şartlar..... 77
Tablo 3.14. High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) İçeriği 78
Tablo 4.1. Mikroskobik bakı sonuçlarının yerleşim yerlerine göre dağılımı 82
Tablo 4.2. RLB sonuçlarının yerleşim yerlerine göre dağılımı ve mikroskobik bakı ile kıyaslanması 85
Tablo 4.3. Sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin yayılışına yaşın etkisi 87
Tablo 4.4. Sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin yayılışına cinsiyetin etkisi 88
Tablo 4.5. Sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin yayılışına ırkın etkisi 89
Tablo 4.6. Karadeniz Bölgesi izolatlarının kendi aralarındaki maksimum identiklik oranları 93
Tablo 4.7. *Babesia bovis* pozitif izolatların GenBank aksesyon numaraları..... 93
Tablo 4.8. Kıyaslaması yapılan diğer *B. bovis* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler 100
Tablo 4.9. *Babesia bovis* izolatların *msa-2c* gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları..... 101

Sayfa no

Şekil 2.1. *Babesia* ve *Theileria* türlerinin 18SrRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları 18

Şekil 2.2. *Babesia* türlerinin yaşam siklusu 21

Şekil 2.3. *Babesia bovis*'in eritrositlere invazyonu 33

Şekil 3.1. Kan örneklerinin alındığı iller ve örnek sayıları 64

Şekil 4.1. Eritrosit içerisindeki *Babesia bovis* trofozoitleri (Orijinal)..... 81

Şekil 4.2 *Theileria* ve *Babesia* türlerinin 18S rRNA gen bölgesinden ~390-430 bp'lik bölgenin amplifikasyonunun jel elektroforezde görünümü (Orijinal) 83

Şekil 4.3. RLB sonuçlarının görüntüsü (Orijinal) 84

Şekil 4.4. *Babesia* türlerinin Nested-PCR sonucu jel elektroforezde görünümü (Orijinal) 901

Şekil 4.5. *Babesia bovis* pozitif örneklerin *msa-2c* primeri ile PCR'ı sonucu jel elektroforezde görünümü (Orijinal) 91

Şekil 4.6. *Babesia bovis* pozitif örneklerin 798 bp büyüklüğündeki bantlarının kesilerek jelden ekstraksiyonu sonucu elektroforezde görünümü (Orijinal)..... 92

Şekil 4.7. Amasya izolatının sekans dizilimleri (GU647150)..... 94

Şekil 4.8. Bartin izolatının sekans dizilimleri (GU647149)..... 94

Şekil 4.9. Bolu izolatının sekans dizilimleri (GU357634) 95

Şekil 4.10. Giresun izolatının sekans dizilimleri (GU647154) 95

Şekil 4.11. Karabuk (4107) izolatının sekans dizilimleri (GU004533) 96

Şekil 4.12. Karabuk-2 izolatının sekans dizilimleri (GU647147)..... 96

Şekil 4.13. Kastamonu izolatının sekans dizilimleri (GU647148)..... 97

Şekil 4.14. Samsun-1 izolatının sekans dizilimleri (GU647152)..... 97

Şekil 4.15. Samsun-2 izolatının sekans dizilimleri (GU647153)..... 98

Şekil 4.16. Trabzon izolatının sekans dizilimleri (GU647151)..... 98

Şekil 4.17. İzolatların *msa-2c* gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbor-joining). 99

Şekil 4.18. *Babesia bovis* izolatlarının *msa-2c* gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin kıyaslanması..... 103

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Subtropikal iklim kuşağında yer alan Türkiye'nin ekonomisinde hayvancılık çok önemli bir paya sahiptir. Bununla beraber son yıllarda tarımsal ihracat içerisinde hayvancılığın payında önemli azalmalar olmuştur. Türkiye İhracatçılar Meclisi (TİM)'nin verilerine göre toplam ihracat içerisinde tarımsal ihracatın oranı 1990'lı yıllarda %17,54 iken, 2009 yılında %15,34'e gerilemiştir. Tarımsal ihracat içerisinde hayvansal ürünlerin payı ise 1990 yılında %11,15 iken, 2009 yılında %5,57'ye düşmüş; toplam ihracat içerisinde hayvancılığın payı da %1,95'ten %0,85'e gerilemiştir.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'nun 2009 yılı verilerine göre Türkiye'nin hayvan varlığını; 10.723.958'si sığır ve 87.207'si manda olmak üzere toplam 10.811.165 büyük baş; 21.749.508'i koyun, 4.981.299'u kıl keçisi ve 146.986'sı tiftik keçisi olmak üzere toplam 26.877.793 küçük baş; 229.969.403'ü tavuk, 2.755.349'u hindi, 944.731'i kaz ve 412.723'ü ördek olmak üzere toplam 234.082.206 kanatlı; 166.753'ü at, 234.182'si eşek ve 51.548'i katır olmak üzere toplam 452.483 tek tırnaklı; 1041 deve; 1.896 domuz; 5.339.224 arı kovanı ve 5.683 adet ipek böceği kutusu oluşturmaktadır. Türkiye'de mevcut sığır varlığının 3.723.583'ünü (%34,72) kültür ırkı, 4.406.041'ini (%41,08) melez ve 2.594.334'ünü (%24,20) yerli ırklar teşkil etmektedir. 2009 yılı verilerine göre sağılan inek sayısı 4.133.148 baş/yıl iken, kesilen sığır sayısı 1.502.073 baş/yıl'dır. Elde edilen süt miktarı 11.583.313 ton/yıl iken, et miktarı ise 325.286 ton/yıl'dır.

Türkiye'de hayvancılığın gelişmesini olumsuz yönde etkileyen barınak, bakım ve besleme gibi yetiştiricilik hatalarının yanında, bakteriyel, viral ve paraziter orijinli hastalıklar halen daha hüküm sürmektedir. Paraziter hastalıklar içerisinde en yaygın olanlarından biri de çok önemli bir protozoon hastalık olan babesiosis'tir. Türkiye'ye ithal edilen kültür ırkı sığırlar ve bunların melezleri babesiosis'e karşı oldukça duyarlı ve bu hastalığın tehditi altındadırlar. Hastalık, özellikle kültür ırklarında yüksek oranda ölümlere neden olmaktadır. Ayrıca et ve

süt verimlerinde önemli ölçülerde düşüşlere de neden olan babesiosis, dolayısıyla Türkiye ekonomisine önemli oranda zarar vermektedir.

Babesiosis; tropik ve subtropik iklim kuşağındaki evcil ve yabani memeli hayvanlar ile insanlarda da görülen ve vektör kenelerle transovarial ve transstadial olarak nakledilen zoonotik karakterli bir hastalıktır. Hastalık özellikle yaz aylarında vektör kenelerin aktifleşmesiyle birlikte yüksek ateş, anemi, anoreksi, kaşeksi, hemoglobinüri, hipotansif şok ile seyretmekte ve ölümlere neden olmaktadır. Önceleri sadece memeli hayvanların bir hastalığı olarak bilinen babesiosisin son 35 yıldır insanlar için de önemli bir hastalık olduğu bildirilmiştir. Bugüne kadar insanlarda *Babesia microti, B. divergens, B. bovis, B. canis, B. duncani* (WA1), *B. venatorum* (EU1) türleri ile MO1 ve KO1 suşlarının babesiosis'e sebep olduğu rapor edilmiştir.

Halk arasında "Ağrıma, Ağrık, Sarılık" gibi isimlerle bilinen babesiosis'in teşhisinde klinik semptomların yanında, mevsim, kene enfestasyonu, unstabil bölge gibi epidemiyolojik veriler de şüpheleri artırabilmektedir. Ancak hastalığın teşhisi, perifer kandan yapılmış ve Giemsa ile boyanmış preparatların mikroskobik incelenmesinde eritrositler içerisinde parazitin görülmesiyle olur. Hastalığa hangi türün yol açtığını belirlemek için ise, parazite karşı oluşan spesifik antikorların serolojik yöntemlerle (IFAT, ELISA, IHA vb.) saptanması veya parazit DNA'sının moleküler yöntemlerle (PCR, RLB, Nested-PCR, Real-Time PCR vb.) tespit edilmesi gerekir.

Sığırlarda bu hastalığa *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. major* ve *B. divergens* türleri yol açmaktadır. Sığırlarda en sık görülen türlerden biri olan ve zoonotik öneme de sahip olan *B. bovis* küçük *Babesia* türlerindendir. Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada dışında tüm dünyada görülen bu tür, Güney Amerika, Güney Avrupa, Orta Doğu ve Rusya'da yaygın olarak görülmektedir. *Babesia bovis*'in Türkiye'deki durumu hakkında yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunu mikroskobik ve serolojik çalışmalar oluşturmaktadır. Moleküler çalışmaların sayısı ise oldukça sınırlıdır.

Babesia bovis'in eritrositler içerisindeki merozoitleri; armut, yuvarlak veya düzensiz şekillidirler. *Babesia bovis* merozoitleri, 2,4-1,5 µm büyüklüğünde olup genellikle eritrositlerin ortasına yerleşirler. Bu merozitler elektron mikroskopta incelendiğinde bunların yüzeyinde bir membran bulunduğu görülmüş ve bunun merozoit yüzey antijenleri olduğu ortaya konulmuştur. *Babesia bovis*'te; *msa-1*, *msa-2a*$_1$, *msa-2a*$_2$, *msa-2b* ve *msa-2c* olmak

üzere beş adet merozoit yüzey antijeni bulunmaktadır. Dünyada *B. bovis*'e karşı aşı geliştirilmesi konusunda en sık araştırılma yapılan gen *msa-2c* antijenidir.

Bu çalışma ile Karadeniz Bölgesi'ndeki sığırlardan *B. bovis* DNA izolatlarının elde edilmesi, *msa-2c* gen bölgelerinin moleküler yöntemlerle teşhis edilmesi, bu bölgenin sekanslanması ve GenBanka kayıtlarının yapılması ile dünyadaki benzer suşlarla filogenetik olarak akrabalık derecelerinin tespit edilmesi ve *B. bovis*'e karşı aşı geliştirme çalışmalarında çok önemli olan yüzey antijenlerinin moleküler olarak karakterizasyonlarının net olarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BABESIOSIS'İN TANIMI VE TARİHÇESİ

Babesiosis; Apicomplexa anaç altındaki *Babesia* türlerinin meydana getirdiği, tropik ve subtropik bölgelerdeki evcil ve yabani hayvanlar ile insanlarda da görülen, *Ixodidae* ailesine bağlı vektör keneler tarafından transovarial ve transstadial olarak nakledilen zoonotik karakterli bir protozoer hastalıktır. Hastalıkla ilgili ilk bilgiler, 19. yüzyılın sonlarında ortaya çıkmıştır. İlk defa 1888 yılında Romanya'da, sığırlarda görülen ve hızla yayılan bir hastalığın sebebinin ne olduğunun araştırılması amacıyla Romanya Hükümeti tarafından görevlendirilen Victor Babes sığır eritrositleri içerisinde birtakım mikroorganizmler keşfetmiş ve bunların "sığır hemaglobinürisi" ile bağlantısı olduğunu ileri sürmüştür. Babes, daha sonra aynı mikroorganizmleri koyun eritrositlerinde de gözlemlemiştir. Diğer yandan Amerika Birleşik Devletleri'nde 1893'de Smith ve Kilborne "Texas Fever" olarak adlandırılan hastalıkta, eritrositler içindeki etkeni, *Pyrosoma bigeminum* olarak isimlendirmişler ve bunun bir kene tarafından nakledildiğini de keşfetmişlerdir. Aynı yıl Starcovici, bu parazitlere sırasıyla *Babesia bovis*, *B. ovis* ve *B. bigemina* isimlerini vermiştir (1, 2). Diğer yandan "Texas Fever" (babesiosis) etkeni *Pyrosoma bigeminum* (*Babesia bigemina*)'un vektör kene *Boophilus annulatus* tarafından sığırlara nakledildiğinin yayınlanmasından sonra babesiosis, dünyanın çeşitli bölgelerinde de keşfedilmiştir. Avustralya'da Dr. Sidney Hunt babesiosis'i (bovine redwater), "Texas fever"'ın identiği olarak konfirme etmiştir. Arjantin'de, 1903'te Lignieres sığır babesiosisi (Tristeza) için form A ve form C olmak üzere iki form tarif etmiş olup bunlardan birinin Smith ve Kilborne'un tanımladığına benzer şekilde büyük, diğerinin ise daha küçük intraeritrositik etkenler olduğunu bildirmiştir. Aynı araştırmacı, küçük olan etkenin, genellikle kan frotilerinde zor görülmesine karşın, böbrek ve merkezi sinir sisteminin

meningslerindeki kapillarlardan yapılan frotilerde daha kolay tespit edilebildiğini bildirmiş, 1910 yılında bu küçük organizmaları önce *Piroplasma argentina* daha sonra *Babesia argentina* olarak isimlendirmiştir. *Babesia argentina* ismi Avusturalya ile Güney ve Orta Amerika'da uzun yıllar kullanılmıştır. Bu durum 1970'li yılların ortalarına kadar sürmüş, *B. argentina* ile *B. bovis*'in aynı özelliklere sahip olduğu anlaşılmış ve isimlendirmede *B. bovis*'in kullanımının daha uygun olacağı kabul edilmiştir (1, 2). M'Fadyean ve Stockman 1911'de İngiltere'de yine sığırlarda genellikle eritrositin periferinde yer alan etkenler tespit etmişler ve bunları önce *Piroplasma divergens* daha sonra *Babesia divergens* olarak isimlendirmişlerdir (1, 2). Yine aynı araştırıcılar 1911 yılında *B. bigemina*'ya benzer büyük bir etkenin bulunduğunu bildirmişler, daha sonra Sergent ve arkadaşları 1926 yılında bu etkeni *B. major* olarak adlandırmışlardır (1, 2). Brocklesby 1976 yılında sığırlarda babesiosis etkenlerinden *B.bigemina, B.major, B.bovis* ve *B.divergens*'in önemli olduğunu bildirmiştir. Sığırlardaki *Babesia* türlerinin 1960'lı yılların sonlarında Hoyte ve 1976 yılında Brocklesby tarafından gözden geçirilmesini takiben, *B. bovis* (*B. argentina*; *B. berbara*; *B. colchica*), *B. bigemina*, *B. divergens* (*B. caucasica*; *B. occidentalis*; *B. karelica*) ve *B. major*'ün sığırlarda babesiosise yol açan başlıca türler oldukları kabul edilmiştir (3, 4).

Türkiye'de ilk babesiosis olgusu, Nicoll ve Adil Bey tarafından 1890'da sığırlarda tarif edilmiş, bunu Samuel ve Raif, İbrahim Ekrem, Lestoquard, Gören ve Yetkin, Aysoy'un çalışmaları izlemiştir. Takiben 1950- 1980 arasında mikroskobik; 1980'li yılların sonunda mikroskobik bakının yanında serolojik; 2000'li yılların başlarında ise bunlara ilave nükleik asit tabanlı moleküler araştırmalar yapılmıştır (5).

2.2. *BABESIA* TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ

Babesia türlerinin Systema Naturae 2000'e göre sistematikteki yerleri aşağıdaki gibidir (6).

Biota (Canlılar)

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

Kingdom: ***Protozoa*** (Goldfuss,1818) R.Owen, 1858

Subkingdom: ***Bicilialata***

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

Phylum: ***Myzozoa*** Cavalier-Smith ve Chao, 2004

Subphylum: ***Apicomplexa*** Levine, 1970

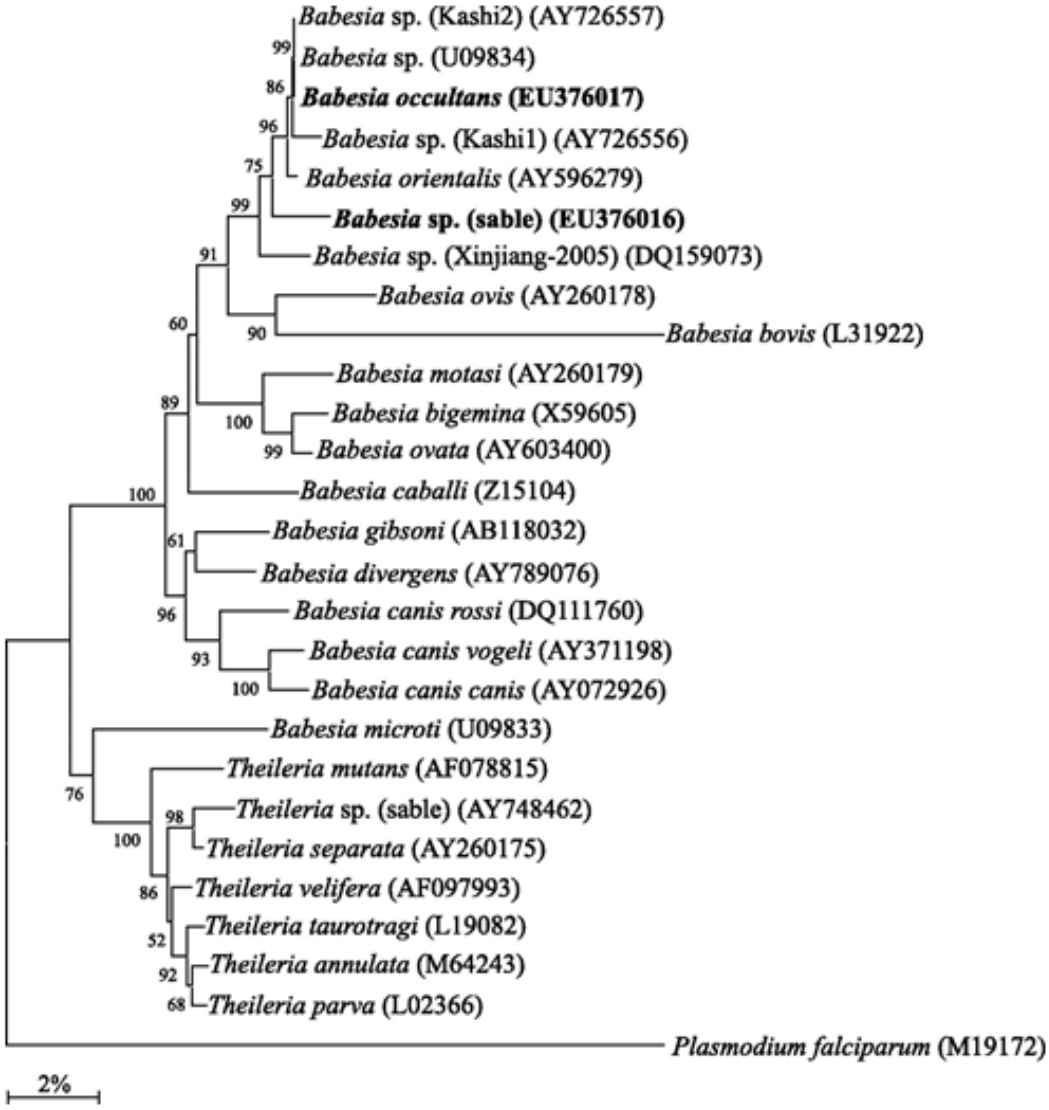
Class: ***Aconoidasida*** Mehlhorn, Peters ve Haberkorn, 1980

Order: ***Piroplasmorida*** Wenyon, 1926

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

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

Son yıllarda moleküler olarak *Babesia* ve *Theileria* türlerinin sınıflandırılmasında 18S rRNA gen bölgelerine göre filogenetik akrabalık dereceleri esas alınarak da sınıflandırmalar yapılmaktadır (7) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Babesia* ve *Theileria* türlerinin 18SrRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (7).

2.3. *BABESIA* TÜRLERİNİN HAYAT SİKLUSU

Babesia türleri heteroksen gelişme gösteren protozoonlardır. Bu gelişme omurgalı konaklar ile *Ixodidae* ailesine bağlı kenelerde olmak üzere iki safhada gerçekleşir. *Babesia* türlerinin yaşam döngüleri genel olarak birbirine benzemektedir. Bütün *Babesia* türleri doğal olarak enfekte kenelerin konaklarından kan emmeleriyle nakledilirler. Hayat sikluslarındaki başlıca farklılıklar, bazı *Babesia* türlerinde [gerçek (true) (=*sensu stricto*) *Babesia* spp.) ve gerçek olmayan (=*sensu-lato*) *Babesia* (*B. microti*-benzeri, örn. *Theileria annae*)] transovaryal naklin varlığı ile ilgilidir (8-10).

2.3.1.Omurgalı Konakta Gelişme

Enfekte kene kan emmek için konağını soktuğunda sporozoitler, konağa enjekte olurlar ve doğrudan eritrositlere girerler. Bu sporozoitler ön kısımlarında polar halka, mikronemler ve roptriden oluşan apikal kompleksi ihtiva etmektedirler. *Babesia* sporozoitlerinin konak eritrositlerine giriş fenomeni, *Babesia* türlerini *Theileria* türlerinden ayırır. *Theileria* sporozoitleri, başlangıçta lenfositlere veya monositlere girerler ve orada şizogoni gelişimini tamamladıktan sonra merozoit olarak eritrositlere penetre olurlar (4). Konakta, enfekte eritrositler içerisindeki *Babesia* sporozoitleri, piroplazm (trofozoit) haline gelişirler. Trofozoitin olgunlaşması ile, sitoplazmada meydana gelen değişimler sonucunda, mikronem, roptri, subpelliküler mikrotubuller ve polar halka gibi apikal kompleks'i oluşturan yapılar tekrar meydana gelir. Olgunlaşan trofozoit, şizogoniye benzer şekilde ikiye bölünerek çoğalır (11-13). Bu bölünme sırasında parazitin yuvarlak, oval formdan, ameoboid ve armut formlarına kadar değişen şekilleri görülür ki, bunlara piroplasmik formlar da denilmektedir. Trofozoit ikiye veya dörde bölünerek kız hücreleri (merozoitler) meydana getirir. Mackenstedt ve ark. (14) *B. bigemina*'da, diploid DNA seviyesine sahip piroplasmlardan farklı olarak "gamont prekürsörleri" adı verilen oval şekilli bir merozoit identifiye etmişlerdir. Bu gamont prekursörleri, vektör kene tarafından alınıncaya kadar gelişmezler. Diğer yandan enfekte eritrositin parçalanması sonucu serbest kalan merozoitler, diğer sağlam eritrositlere girerek onları da enfekte ederler. Bu şekilde enfeksiyon ya konağın ölümüyle veya konağın direnç (immunite) kazanıp parazitleri temizlemesiyle sonuçlanır (15, 16) (Şekil 2.2).

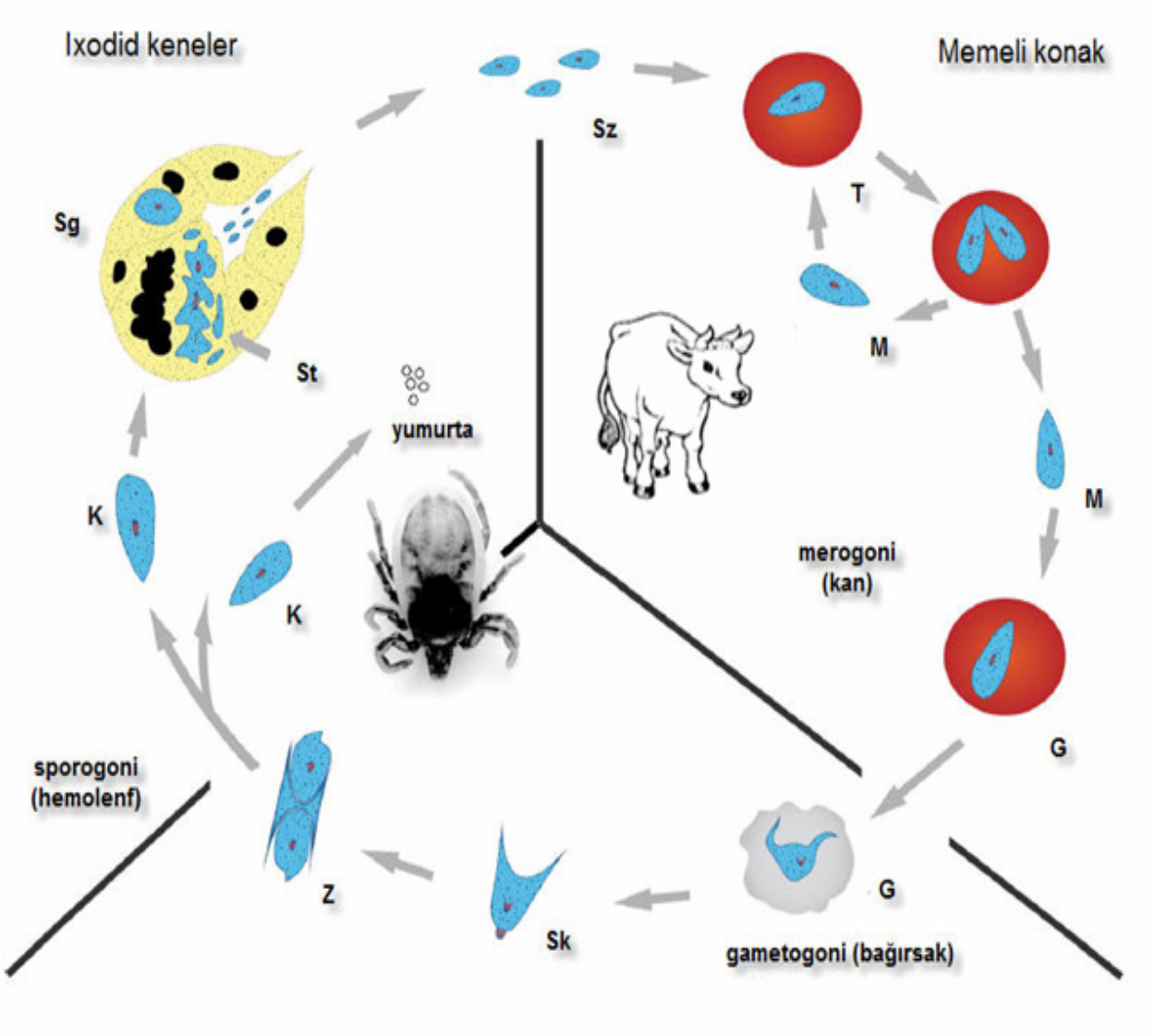
2.3.2. Vektör Kenede Gelişim

Babesia türlerinin enfekte konaktan kan emen vektör kenede ve vertikal (transovarial) olarak enfekte doğan larvalarda çeşitli gelişim evreleri geçer. Vektör kenenin enfekte konağından emdiği kanın kenenin orta bağırsağına geçmesiyle değişiklikler başlar. Enfekte eritrositlerle alınan gamontlardan "strahlenkörper" adı verilen, çıkıntılı formda ışınsal-cisimciklerinin (ray-bodies) iki populasyonu oluşur (17). Daha sonra bunlar eritrosit içerisinde çoğalmalarını sürdürür ve çoğalma, bunlar ortaya çıktıktan sonra da devam eder. Çok çekirdekli ışınsal cisimciklerin bir araya gelmesiyle büyük topluluklar oluşur. Bir kez bölünme olduğunda haploid sayıda tek çekirdekli ışınsal cisimcikler meydana gelir (14). Daha sonra bu yapıların bir çifti bir araya gelerek singami (17) yolu ile küresel hücre olarak da adlandırılan zigotu (13) oluştururlar. Oluşan zigot, kene bağırsağında tercihen sindirim hücrelerini enfekte eder. Muhtemelen burada çoğaldıktan sonra, vitellojen sentezleyen bazofilik hücrelere yerleşir.

Burada daha fazla bölünmeyle hareket kabiliyetli ookinetler (vermiküller, sporokinetler) meydana gelir. Daha sonra kinetler, buradan kenenin hemolenfine göç ederler (18). *Babesia bigemina*, kene bağırsağındaki gelişiminin bazı safhalarında, haploid sayıda zigot oluşturmak için tek basamaklı bir mayoz geçirir (14, 19). Kene bağırsak hücrelerinde, poliploid kinetlerin şekillenmesiyle şizogoni oluşur (14). Bu çomak şekilli hareketli kinetler kenenin hemolenfine geçerek ovaryumlar dahil olmak üzere değişik tipte hücre ve dokuları enfekte ederler ki, buralarda sekonder şizogoninin tekrarlayan siklusları gerçekleşir. Böylece, enfekte kenenin yumurtalarıyla larval döneme transovarial nakil gerçekleşir. Bu nakil, tek konutluluk özelliğine sahip *Boophilus* gibi vektörler için olduğu kadar, *Babesia* için de önemli bir hayat siklusu adaptasyonudur.

Transovaryal yolla enfekte doğan larvalarda kinetler, tükürük bezi salgı hücrelerine girerler ve çok çekirdekli dönemlere transforme olurlar. Sporogoni yolu ile önce sporoblastlar, sonra sporoblastların parçalanmasıyla küçük, haploid sayıda sporozoitler meydana gelir (14) (Şekil 2.2).

Bütün *Babesia* türlerinde sporozoit gelişimi, her zaman enfekte kene kan emmek için omurgalı konağına tutunduğunda başlar. *Babesia bigemina'*da, sporozoitlerin gelişimi enfekte larvanın konağından kan emmesiyle başlar. Ancak enfektif sporozoitlerin ortaya çıkması yaklaşık 9 günü alır. Dolayısıyla enfektif sporozitler, sadece kenenin nimf ve ergin dönemlerinde ortaya çıkabilirler (20, 21). Nakil, larva döneminin dışında kalan nimf dönemi ve ergin (erkek ve dişi) gelişme dönemlerinde gerçekleşebilir (22-24). Bu durum, *B. bovis'*te farklılık gösterir. *Babesia bovis'*te enfektif sporozoitlerin oluşumu, enfekte doğan larvanın konağından kan emmeye başlamasını takiben 2-3 günde gerçekleşir (25).



Şekil 2.2. *Babesia* türlerinin yaşam siklusu. *Babesia* türlerinin yaşam siklusu merogoni, gametogoni ve sporogoni evrelerinden oluşur. Enfekte kenenin kan emmesi esnasında sporozoitler (Sz) memeli konağa transfer olur. Sporozoitler daha sonra eritrositlere girer ve trofozoitlere (T) dönüşür. Trofozoitler ikiye bölünerek merozoitleri (M) meydana getirir. Bazı trofozoitler gametositlere (G) dönüşür. Gametositler vektör kenede enfeksiyonu başlatabilir. Kene bağırsağında gametositler "Strahlenkörper" (Sk) cisimciklerine dönüşür. Bu cisimcikler birleşerek zigotu (Z) oluştururlar. Zigottan da kinet (K) meydana gelir. Kinetler kene hemolenfine girer, çoğalır ve kenenin çeşitli organlarına girer. *Babesia* türleri ovaryumları enfekte edebilir ve transovaryal olarak yumurta yoluyla nakledilebilir. Kenelerin bütün yaşam evreleri (larva, nimf, olgun dişi) potansiyel enfektif olabilir. Bunun yanında *B. microti*-benzeri türler yalnızca bir yaşam evresinden diğerine transstadial olarak nakledilebilmektedir. Kinetler kenenin tükürük bezine (Sg) girdiğinde sporogoni evresi başlar. Burada parazit çok çekirdekli sporoblastlara (St) dönüşür. Sporoblastlardan yeni gelişen sporozoitler kenenin kan emmesiyle memeli konağa nakledilir (26).

2.4. SIĞIRLARDAKİ *BABESIA* TÜRLERİ

Sığırlarda babesiosis'e; *B. bigemina*, *B. bovis, B. divergens*, *B. major* türleri sebep olmaktadır. Bu türlere ilaveten *B. jakimovi*, *B. occultans* ve *B. ovate* türlerinin de sığırlarda görülebildiği bildirilmiştir (4).

2.4.1. *Babesia bigemina* (Smith ve Kilborne, 1893)

Büyük *Babesia* türlerinden olup eritrositler içerisinde armut, yuvarlak, oval veya düzensiz şekilli olup genellikle çift armut formundadır. Yuvarlak formları 2-3µ çapta, uzamış formları ise 4-5µ uzunluğundadır. Eritrositer formlarda konoid, mikroporlar ve tipik mitokondri yoktur. Buna karşın, anterior ve posterior polar halka ve tipik iki adet roptri bulunur (13, 25, 28).

2.4.1.1. Yayılış ve Epidemiyoloji

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

Türkiye'de ilk olarak 1890'da Nicole ve Adilbey tarafından mikroskobik tarifi yapılan *B. bigemina*'nın yol açtığı sığır babesiosis'i çalışmaları; İbrahim Ekrem (29), Lestoquard (30), Gören ve Yetkin (31), Aysoy (32), Mimioğlu (33), Kurtpınar (34)'ın araştırmaları ile devam etmiştir. Mimioğlu (33) Karadeniz Bölgesi'nde mikrokosobik bakısını yaptığı 70 sığırın 5'inde, Göksu (35) Ankara civarında 996 sığırın 6'sında ve takiben Özcan (36) Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine getirilen 194 sığırın 2'sinde *B. bigemina*'yı pozitif bulmuşlardır. Diğer yandan Erkut (37) Ege Bölgesi'nde incelediği 141 sığırın 7'sinde piroplasmosmosis görüldüğünü; Göksu (38) Karadeniz Bölgesi'nin bazı illerinde 37'si babesiosisden şüpheli, 43'ü sağlıklı toplam 80 sığırın 3'ünde, yine aynı araştırıcının Doğu Anadolu sığırları (39) ile Türkiye'nin farklı bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları üzerine yaptığı araştırmasında (40) Ege ve Marmara Bölgelerinde *B. bigemina*'nın bulunduğu rapor edilmiştir. Takiben Hoffman ve ark. (41) Türkiye'nin Asya bölümünde sığırlarda piroplasmosis vakalarının yaygın olduğunu ve muayenesi yapılan sığırların %3,5'inde hastalığın *B. bigemina*'dan kaynaklandığını; Mimioğlu ve ark. (42) Türkiye'de *B. bigemina*'nın diğer *Babesia* türlerine göre daha yaygın olduğunu ileri sürmüştür.

Türkiye'de sığır ve koyunlarda görülen anaplosmosis, piroplasmosis ve theileriosis olguları uluslararası epizootiyoloji bülteninde yer aldıktan sonra mikroskobik olarak *B. bigemina*; İstanbul ve çevresinde piroplasmozis semptomu gösteren 112 sığırın 13'ünde (43), Elazığ yöresinde 69 piroplasmosis şüpheli sığırın 4'ünde (44), Ankara'nın Beytepe köyünde 185 sığırın 3'ünde (45) görülmüştür. Öte yandan *B. bigemina*'nın Van Bölgesi sığırlarında bulunduğu (46), Karadeniz Bölgesi'nde 76 sığırın 72'sinde *Babesia* sp. saptandığı rapor edilmiştir (47). Aynı dönemde Ankara'nın Çubuk ilçesinde *B. bigemina*'nın mikroskobik insidensi %18,8 olarak bulunmuştur (48). Diğer yandan *B. bigemina*'nın mikroskobik prevalansı, Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde %0,5-1 arasında (49), Samsun yöresi sığırlarında %32,21 (50); Kayseri yöresinde %6,8 (51) olarak rapor edilmiştir. Takiben *Babesia* spp. prevalansı, Konya yöresinde %11,46 (52), Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde %0,6-1,4 arasında (53), Adana yöresinde ise %31,8 (54) oranında bildirilmiştir. Diğer yandan Konya'da Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine getirilen 11 günlük bir buzağıda *B. bigemina*'dan ileri gelen akut babesiosis olgusu tespit edilmiştir (55).

Türkiye'de sığırlarda babesiosis'in serolojik teşhisi, IFAT ile seroinsidens şeklinde ilk kez Ankara'da yapılmış ve 185 sığırın 9'unda *B. bigemina*'ya karşı antikor saptanmıştır (56). Takiben bir kısım araştırıcı (45, 47, 48, 51-53, 57-63) IFAT ile *B. bigemina'*ya karşı antikor araştırmıştır.

Sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine yapılan çalışmalarda *B. bigemina*; Karadeniz Bölgesi'nde 76 sığırın 47'sinde (%61,84) (47), Ankara'nın Çubuk ilçesinde ise %100 bulunmuştur (48). Takiben *B. bigemina* seropozitifliği; Ankara civarında %49 (58), %80 (59), %7,3 (62) ve %8,8 (61); Adana yöresinde %55 (64) ve %75 (60); Elazığ'da %31,9, Malatya'da %7,1 ve Tunceli'de %7,3 (53); Konya yöresinde %53,07 (52); Kayseri yöresinde %23,03 (51) ve Antakya yöresinde %0,9 (63) olarak bildirilmiştir. Türkiye genelinde *B. bigemina* seropozitifliği, Karadeniz Bölgesi'nde %61,8, Doğu Anadolu Bölgesi'nde %42,9, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde %48,8, Akdeniz Bölgesi'nde %50,8, Marmara Bölgesi'nde %48,9 ve Ege Bölgesi'nde %68,5 olarak rapor edilmiştir (59). Öte yandan Türkiye'de sığır babesiosis'inin mevsimsel seroinsidensi ve hastalık insidensi, ilk kez Çukurova bölgesinde araştırılmış ve yapılan seroepidemiyolojik yoklamayla mevsimsel seroinsidens *B. bigemina* için 0,600, hastalık insidensi ise 0,030 olarak saptanmıştır (60).

Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmelere paralel olarak, hastalık etkenlerinin DNA'sını ortaya koymaya yönelik moleküler yöntemler (PCR, RLB vb.) ortaya çıkmış ve

kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde bu yöntemler, hastalık etkenlerinin teşhisinde tercih edilir olmuşlardır. Bu gelişmelere paralel olarak, revers line bloting (RLB) tekniği geliştirilmiş ve ilk defa aynı kenede bulunabilen 4 *Borrelia* türünün ayrılması için kullanılmıştır (65). Bu test PCR ürünlerinin bir membranda ayrı sıralara bağlanmış özgün problara hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. Teknik, birçok etkenin aynı anda birçok prob ile karşılaştırılmasına olanak sağladığından, oldukça pratik ve kullanışlıdır. Nitekim Gubbels ve ark. (66) bu tekniği sığırlardaki, Schnittger ve ark. (67) ise koyun ve keçilerdeki *Theileria* ve *Babesia* türlerinin eş zamanlı teşhisinde kullanmışlardır.

Türkiye'de PCR ile sığırlarda babesiosis'in teşhisi ilk defa Tanyüksel ve ark. (68) tarafından yapılmış olup *B. bigemina* Ankara yöresinde %8,45, Burdur yöresinde %8 ve Kayseri yöresinde %5 olarak bulunmuştur. Bunu takiben Türkiye'de ilk defa RLB ile yapılan çalışmada, Ankara yöresinde *B. bigemina* pozitifliği %6 olarak saptanmıştır (62). Kayseri yöresinde sığırlarda *B. bigemina*'nın moleküler prevalansı %0,6 (69) ve yine Kayseri'de sığır barınaklarından toplanan kenelerde Türkiye'de ilk defa RLB ile *B. bigemina*'nın moleküler prevalansı %14 olarak tespit edilmiştir (70). Diğer yandan Türkiye'nin çeşitli yörelerinden elde edilen *B. bigemina* izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (71, 72). Ayrıca Kayseri yöresinde sığırlardan toplanan keneler üzerinde yapılan moleküler çalışmalar sonucu *Babesia* sp. saptanmış ve bu suş *Babesia* sp. (*Kayseri 1*) olarak Genbanka kayıt ettirilmiştir (70). Doğu Karadeniz Bölgesi'nde sığırlar üzerinde yapılan moleküler çalışmada *B. bigemina* %0,77 oranında tespit edilmiştir (73).

2.4.1.2. Gelişme

Bu etkenin vektörlüğünü, *Boophilus (Rhipicephalus) annulatus*, *B. microplus, B. australis*, *B. calcaratus, B. decoloratus*, *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. evertsi*, *R. bursa* keneleri yapmaktadır (13, 27, 28). Türkiye'de *B. annulatus*, *Hae. punctata* ve *R. bursa* türleri bulunmaktadır. Bu türün gelişim safhaları, genel kısımda anlatıldığı gibidir. İntrauterin bulaşma görülebilir ancak bu, hastalığın epidemiyolojisinde önemli olacak seviyede değildir.

2.4.1.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler

Babesiosis'de klinik belirtiler etkenin vektör kene tarafından konaklara verilmesini takiben 9-12 gün içerisinde ortaya çıkar. Hasta hayvanlarda klinik belirtiler farklılık gösterebilmektedir. Bunun sebebi olarak da farklı coğrafik bölgelerdeki *B. bigemina* izolatlarının patojenitelerindeki farklılıklar gösterilebilir. Yapılan bir çalışmada; Avustralya'daki

sığırlarda tespit edilen *B. bigemina* suşunun hayvanlarda nadiren enfeksiyona sebep olduğu, buna karşın Afrika'da tespit edilen suşun ise çok daha patojenik olduğu rapor edilmiştir (74). Babesiosis'li hayvanlardaki ilk klinik semptom eritrositlerdeki yıkımlara bağlı olarak ortaya çıkan ve 41,5-42 ^{o}C'ye ulaşan yüksek ateştir. Hayvanlarda anoreksi ve ruminal atoni görülür. Tedirginlik, gölgelik alanlara sığınmaya çalışma ve sürekli yerde yatma isteği hasta hayvanlarda gözle görülebilen ilk şüphe uyandırıcı gözlemlerdir. Hayvanlar bulundukları yerde kendi etraflarında kavis çizerler, tüyleri karışmış ve kabarmış olup nefes alışverişlerinde güçlük ve taşikardi görülür. Başlangıçta müköz membranlar kırmızıdır fakat eritrositik yıkımı takiben anemiye bağlı müköz membranlarda soluklaşma oluşur. Anemi çok hızlı bir şekilde meydana gelir ve yaklaşık olarak eritrositlerin %75'i birkaç gün içerisinde yıkımlanır. Buna bağlı olarak da hemoglobinüri ve hemoglobinemi şekillenir. Hemoglobinüri, çoğunlukla olmasına karşın bazı olgularda görülmeyebilir. Hasta hayvanlarda kilo kaybı ve süt veriminde azalmalar görülür. Hemoglobinüriyi takiben ikterus ortaya çıkar. Kan suludur. Akut olgularda, 4-8 gün içinde ölüm görülür. Tedavi edilmeyen hayvanlarda mortalite, %50-90 arasında değişir. Kronik durumlarda ise ateş çok yüksek değildir ve genellikle hemoglobinüri görülmez (27, 75-77).

Akut babesiosis'de konağın plazma bileşiminde değişimler olur. Kinin ve aktif kallikrein düzeyi artar, kininojen seviyesi azalır. Bunlara bağlı olarak damarlarda dilatasyon, kan akışında yavaşlama, kılcal damar duvarlarında bozulmalar olur ve damar duvarlarının geçirgenliği artar. Konglutinin ve fibronektin düzeylerinin azalması sonucu eritrositlerde kümelenme ve kapiller damarlarda tıkanmalar şekillenir. Fibrinojen ile ilgili ürünler artar, plazminojen azalır ve buna bağlı olarak koagulasyon bozuklukları ve eritrosit birikimi görülür. Bu tip patogenez, daha çok parazitli eritrositlerin kümelenerek damarları tıkadığı *B. bovis*'de görülür (28, 76). Bu kapiller blokajın olmadığı *B. bigemina* ve *B. divergens* enfeksiyonlarında ise en önemli patolojik etki, eritrosit hasarıdır (78). Kinin ve benzeri maddelerin eritrosit yüzeyinin ozmotik geçirgenliğini bozmasıyla eritrositler kolayca lize olur (19). Bunun yanında şiddetli patogenezis; kısmen immunite, özellikle genç danaların dirençli olmasında etkili olan ve birçok hücre içi patojene karşı koruyucu immunitede rol oynayan interferon gama (IFN-γ), tümor nekrozis faktör alfa (TNF-α) ve nitrik oksit (NO)'i içeren mediatörlerle ilgilidir (79).

Patogenezisin temeli, eritrositlerdeki devamlı ve şiddetli parazitemi sonucu meydana gelen anemi ve anemik anoksidir. Anemi rejeneratif tipte olup, kan tablosuna bakıldığında

retikülositler ve çekirdekli eritrositler görülür. Meydana gelen vazodilatasyon ve azalan kan dolaşımı sebebiyle, non-spesifik genel bir yangı tablosu oluşur (76, 78, 80). Azalan kan dolaşım hızı sebebiyle, bazı hayati organlarda anoksi meydana gelir ve parazitin toksik ürünleri ya da organlardan kaynaklanan metabolik ürünlerle genel bir organ tahribatı oluşur. Retiküloendotelyal sistem hücrelerinin özellikle de histiyositlerin; ölü, anormal eritrositleri ve çözünmüş fibrini uzaklaştırması yanında enfekte eritrositleri uzaklaştırmada da rolü vardır. Histiyositler, dalak ve lenf nodüllerinin sinüsleri ile karaciğerin sinüzoidlerini doldurarak bu organlarda hipertrofi ve hiperplazilere yol açarlar. Dalak ve lenf yumruları, ödem ve hemoglobinemiye bağlı olarak büyümüş ve siyah renklidir. Hemolitik olaylara oldukça duyarlı olan böbreklerde, glomeruluslar ve renal tubuller hemoglobin ile doludur. Normal şartlarda renal tubullerden geri emilebilen hemoglobin, miktarın fazla olduğu durumlarda emilemeyerek idrara geçer. Böbrekteki hasar, hemolizin şiddetine bağlıdır. Akut olaylarda, böbrek büyümüş ve siyah renklidir. İdrar kesesi, kırmızı renkli idrarla doludur. Koagulasyon mekanizmasında meydana gelen bozukluklar da hastalığın patogenezinde önemlidir (19, 78).

2.4.2. *Babesia bovis* (Babes 1888, Starcovici, 1893)

Küçük *Babesia* türlerindendir. Eritrositler içerisindeki merozoitler; armut, yuvarlak veya düzensiz şekillidirler. Vakuollü taşlı yüzük formları bu tür de yaygın olarak görülür. *Babesia bovis* merozoitleri, 1,5-2,4 µm büyüklüğünde olup genellikle eritrositlerin ortasına yerleşirler (13, 25, 28).

2.4.2.1.Yayılış ve Epidemiyoloji

Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada dışında tüm dünyada görülen bu tür, Güney Avrupa, Orta Doğu ve Rusya'da yaygın olarak görülmektedir. Güney Amerika'da *B. bigemina*'dan daha büyük önem taşımaktadır.

Türkiye'de *B. bovis*, ilk kez Mimioğlu (33) tarafından Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu vilayetlerinde sığırlarda "*Haemataurai vesicalis bovis*" araştırması ile gündeme gelmiş; Göksu (35) Ankara'da incelediği 996 sığırın 2'sinde, takiben aynı araştırıcı (38) bazı Karadeniz illerinde mikroskobik bakısı yapılan 80 sığırın 3'ünde *B. bovis*'i bulmuştur. Göksu (40) Türkiye'nin farklı bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları üzerine yaptığı araştırmasında *B. bovis*'in Marmara ve Güney Doğu Anadolu'da görüldüğünü; Mimioğlu ve ark. (42) *B. bovis* (*Babesia berbera*) Karadeniz bölgesinde daha fazla bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Öte yandan mikroskobik bakıyla, Elazığ yöresinde iç organlarından froti yapılan 4 sığırın 1'inde (44) ve Ankara'da 185 sığırın 1'inde (56) *B. bovis* saptanmıştır.

Babesia bovis'in mikroskobik pozitifliği; Marmara bölgesinde %34,8 (43), Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde %0,5-1,5 arasında (49); Samsun yöresinde %29,53 (50), Kayseri yöresinde %1,04 (51) bulunmuş ve mikroskobik insidensi Ankara'nın Çubuk ilçesinde %9 olarak saptanmıştır (81).

Babesia bovis seroinsidensi; IFAT ile Ankara'nın Beytepe köyünde 185 sığırın 18'inde (45, 56), Ankara yöresinde 46 sığırın 22'sinde (57), Karadeniz bölgesinde 76 sığırın 34'ünde (%44,73) (47), Ankara'nın Çubuk ilçesinde %59 (81) bulunmuştur. Çukurova bölgesinde sığır babesiosis'inin mevsimsel seroinsidensi *B. bovis* için 0,292 ve hastalık insidensi ise 0,030 olarak saptanmıştır (60). *Babesia bovis* seropozitifliği; Türkiye genelinde ELISA ile %51,2 (82); IFAT ile Ankara civarında %10,4 (58), %41,6 (59), %1,3 (62) ve %2,4 (61); Elazığ'da %1,4 ve Tunceli'de %0,6 (53); Kayseri yöresinde %1,04 (51); Doğu Anadolu'da %5,6, Güneydoğu Anadolu'da %6,4, Akdeniz'de %31,6, Ege'de %51,4 ve Marmara'da %41,8 (59) olarak saptanmıştır.

Diğer yandan Türkiye'de *B. bovis*'in moleküler prevalansı; PCR ile Ankara yöresinde %12,68, Burdur yöresinde %8 ve Samsun yöresinde %3,85 (68); RLB ile Ankara yöresinde %2,3 (62), Trakya bölgesinde %1,3 (83) olarak saptanmıştır. Diğer yandan Türkiye'nin çeşitli yörelerinden elde edilen *B. bovis* izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (71, 72).

2.4.2.2. Gelişme

Bu etkenin vektörlüğünü, *Boophilus calcaratus*, *B. microplus, B. australis*, *Rhipicephalus bursa* ve *Ixodes persulcatus* keneleri yapmaktadır (13, 25, 28). Türkiye'de *R. bursa* türü bulunmaktadır. Gelişim safhaları genel kısımda anlatıldığı gibidir.

2.4.2.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler

Babesia bigemina ile benzerdir. İnkübasyon periyodu 2-10 gündür. Yüksek ateş 2-3 gün sürer. *Babesia bigemina*'ya göre daha patojen bir türdür. Anemi, ikterus ve ishal görülür. *Babesia bigemina*'dan farklı olarak hemoglobinüri ve hemoglobinemi oluşabilir fakat her zaman görülmeyebilir. Koagulasyon mekanizmasındaki bozukluklara bağlı klinik belirtiler, *B. bigemina*'dan daha şiddetlidir. Özellikle kapillar damarlarda görülen stazis ve tıkanmalar daha yaygındır. Bu lezyonlar, özellikle beyin kapillarlarında yaygın olarak görülür. Hastalığın akut formunda, hipertansif şok tablosu görülür. Ölüm *B. bigemina*'ya göre daha yaygındır. *Babesia bigemina* ile enfekte hayvanlarda ölüm genellikle hemotokrit değer %10'nun altına

düştüğünde görülürken, *B. bovis* ile enfekte hayvanlarda bu oran %12 veya daha yüksek iken ölümler görülür (23, 74).

2.4.2.4. Zoonotik Önemi

Splenektomili insanlarda, bu türe bağlı babesiosis vakaları rapor edilmiştir (26, 84).

2.4.3. *Babesia divergens* (M'Fadyean and Stockman, 1911)

Küçük *Babesia* türlerindendir (0,4-1,5µm). Merozoitleri, genelde çift halde bulunurlar, aralarındaki açı geniştir ve genellikle eritrositlerin periferine yerleşirler. Ayrıca tombul, armut şeklinde ve yuvarlak formlar da görülebilir. Merozoitlerde, konoid, mikroporlar, tipik golgi aygıtı ve mitokondri yoktur. Mitokondri benzeri veziküller ve 3 veya daha fazla roptri vardır (13, 25, 28).

2.4.3.1. Yayılış ve Epidemiyoloji

Avrupa ve Rusya'da sık görülür. Özellikle Avrupa'nın Kuzey'inde daha yaygındır. Ancak Tunus gibi Akdeniz ülkelerinde de bildirilmiştir.

Türkiye'de *B. divergens* bugüne kadar mikroskobik olarak bildirilmemiştir. Bu türle ilgili serolojik çalışmalar da sınırlıdır. Ankara yöresinde (57) ve Ankara'nın Beytepe köyünde (45, 56) IFAT ile yapılan seroinsidens çalışmalarında ve Antakya yöresinde (63) IFAT ile yapılan seroprevalans yoklamasında *B. divergens*'e karşı antikor saptanamamıştır. Buna karşılık IFAT ile Karadeniz Bölgesi'nde yapılan seroinsidens çalışmasında 76 sığırın 57'sinde *B. divergens*'e karşı antikor oluştuğu saptanmıştır (47). Diğer yandan *B. divergens* seropozitifliği; Doğu Anadolu'da %3,7, Akdeniz'de %7,2, Ege'de %18,5, Marmara'da %2 ve Karadeniz'de %75 (59); Elazığ'da %3,5, Malatya'da %0,6 ve Tunceli'de %1,2 (53) ve Kayseri yöresinde %2,09 (51) olarak bildirmiştir. Çukurova'da sığır babesiosis'inin mevsimsel seroinsidensi *B. divergens* için 0,121; hastalık insidensi ise 0,030 olarak saptanmıştır (60).

Türkiye'de *B. divergens*'in moleküler prevalansı; PCR ile Samsun yöresinde %3,37 (68); Ankara yöresinde RLB ile %1,1 olarak saptanmıştır (61).

2.4.3.2. Gelişme

Bu etkenin vektörlüğünü, *Ixodes ricinus* yapmaktadır (13, 25, 28). Türkiye'de *I. ricinus* türü bulunmaktadır. Gelişim safhaları genel kısımda anlatıldığı gibidir.

2.4.3.2. Zoonotik Önemi

İnsanlarda özellikle de splenektomili kişilerde hastalığa sebep olmaktadır (78, 84, 85).

2.4.4. *Babesia major* (Sergent, Donatien, Parroti Lestoquard and Plantureux, 1926)

Büyük *Babesia* türlerindendir. Merozoitler, eritrositlerin merkezinde yer alır. Çift armut şeklindeki formlar 1,5x2,6 µm, yuvarlak formlar ise 1,8 µm çapında olup aralarındaki açı dardır (13, 25, 27, 28).

2.4.4.1. Yayılış ve Epidemiyoloji

Avrupa'da, Kuzey Afrika'da ve Rusya'da görülmektedir.

Babesia major'un Türkiye'nin Marmara bölgesinde varlığı iddia edilmiş (86) fakat bugüne kadar mikroskobik ve serolojik olarak pozitiflik bildirilmemiştir. Ayrıca, son yıllarda RLB ile yapılan araştırmalarda *B. major*'ün moleküler pozitifliği Ankara yöresinde %0,2 olarak saptanmıştır (61).

2.4.4.2. Gelişme

Bu etkenin vektörlüğünü, *Boophilus calcaratus, Haemaphysalis punctata* keneleri yapmaktadır (13, 25, 28). Türkiye'de *Hae. punctata* bulunmaktadır. Gelişim safhaları genel kısımda anlatıldığı gibidir.

2.4.4.3. Patogenez ve Klinik Belirtiler

Patojenitesi düşük olup, klinik belirtiler *B. bigemina*'ya benzer.

2.4.5. *Babesia jakimovi*

Bu tür büyük *Babesia* etkenlerinden olup özellikle Sibirya'da sığırlarda görülmekte, bunun yanında karacalarda ve ren geyiklerinde de hastalığa sebep olmaktadır. Transovaryal olarak *Ixodes ricinus* kenesi tarafından nakledilmektedir. Ayrıca mekanik olarak at sinekleri tarafından da nakledildiği bildirilmiştir. Klinik belirtiler *Babesia bigemina*'ya benzemektedir (8).

2.4.6. *Babesia occultans*

Bu tür özellikle Güney Afrika'daki sığırlarda görülmekte olup *B. bigemina*'dan biraz küçük bir türdür. *Hyalomma marginatum rufipes* vektörlüğünü yapmaktadır (2, 19).

2.4.7. *Babesia ovate*

Bu tür de büyük *Babesia* etkenlerinden olup özellikle Japonya'daki sığırlarda tespit edilmiştir. *Babesia bigemina*'ya benzemektedir. Vektörlüğünü *Haemaphysalis longicornis* yapmaktadır (87).

2.5. *BABESIA* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER BİYOLOJİK MEKANİZMALARI VE YAPILARI

2.5.1. Eritrositlere Giriş Mekanizması

Apicomplexan parazitler için eritrosit içerisine invazyon, hayat sikluslarının en önemli basamağını oluşturur. Hemoprotozoon parazitlerin ekstraselüler merozoitleri, direkt konak humoral immun yanıt komponentlerine maruz kalırlar. Zira antikorlar, enfekte olmuş eritrositlerin içerisindeki parazitlere asla ulaşamaz. Bu açıdan merozoitlerin eritrositlere tutunmasının engellenmesi, potansiyel aşı çalışmalarında önemlidir. Apicomplexan parazitler, hücreye invazyon esnasında çeşitli molekülleri (ligandları) kullanırlar. Genel olarak parazitin gireceği konak hücresine temasını takiben bir invaginasyon meydana gelir ve bir parazitifor vakuol oluşur (88, 89). Parazit, bu parazitifor vakuol içerisinde konak hücresine girer. Bu vakuol, konak hücreye ait membran taşıdığından ilk etapta parazitin, konak hücrenin savunma mekanizmasından korunmasını sağlar. Takiben konak hücreye ait membranın lize olmasıyla parazit, hücre içerisinde serbest kalır. *Theileria*, *Plasmodium* ve *Babesia* gibi parazitlerin konak eritrositlerine girişinde farklılıklar vardır. *Theileria* sprozoitleri, öncelikle lenfoid doku hücrelerine girerler. Lenfoid hücrelerde şizogoni dönemi geçirdikten sonra merozoitler teşekkül eder ve merozoitler, direkt olarak (parazitofor vakoul oluşturmadan) konağın dolaşım kanında eritrositlere girer. Öte yandan *Plasmodium* sporozitleri, öncelikle hepatositleri enfekte ederler ve daha sonra eritrositlere girerler. *Plasmodium* merozoitlerinin eritrositlere girişi direkt olmayıp bir parazitifor vakuol içerisinde olur (90, 91). Buna karşılık *Babesia* sporozitleri ise farklı olarak, doğrudan ve bir parazitofor vakuol oluşturmadan eritrositlere girerler (92, 93).

Babesia sporozoitleri, enfekte kenenin kan emmesi sırasında konak kan dolaşımına geçerek eritrositleri istila eder. Sporozoitlerin eritrositlere girişi endositozisle olur. Sporozoitin temas ettiği eritrositin yüzeyinde, önce aktin ve myozinin rol aldığı mekanizma ile bir invaginasyon meydana gelir. Bunu takiben sporozoitler, direkt olarak (vakuol oluşturmadan) konak eritrositine girerler. Bu şekilde eritrosit içerisine giren sporozoitler, trofozoit şekline dönüşürler. Olgunlaşan trofozoit, merogoniye benzer şekilde ikiye bölünerek çoğalır.

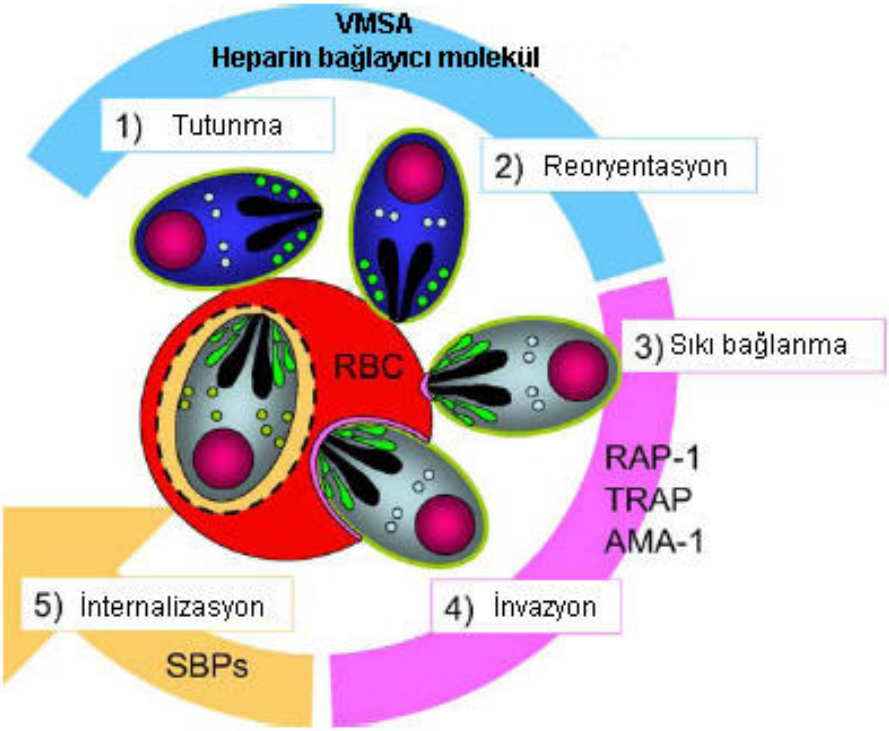
Meydana gelen merozoitler de aynı şekilde sağlam eritrositlere penetre olur ve bu şekilde eritrositleri enfekte ederler (Şekil 2.3) (94, 95). Diğer taraftan merozoitlerin yüzeyinde bulunan komplement 3 (C3) proteininin eritrositlerde bulunan C3 reseptörü ile bağlanması da penetrasyonda önemli rol oynar (96).

Öte yandan *B. gibsoni* tercihen, kalıtsal olarak yüksek konsantrasyonda potasyum (HK), glutamat, aspartat ve glutamin ile düşük seviyede glutasyon (GSH) içeren ve HK eritrositleri adı verilen bazı köpek eritrositlerinde daha iyi çoğalır (97). Özellikle retikülositlerin, normositlere göre fazla miktarlarda hem glutamat ve hem de GSH içermeleri, *B. gibsoni*'nin çoğalması için ortamı elverişli kılar. Nitekim *in vitro* çalışmalarda da *B. gibsoni*'nin, retikulositleri HK eritrosilerine tercih ettikleri gösterilmiştir (97, 98). Bunun sebebi, retikulositlerde mitokondriya bulunmasıdır. Mitokondriyanın bütün ökaryotik hücrelerde enerji üretim merkezi olarak görev yaptığı gerçeğinden hareketle, *B. gibsoni'*nin retikulositlerdeki ATP (Adenozin trifosfat)'yi kullanarak daha kolay çoğalabildiği deneysel olarak ortaya konmuştur (99). Bununla birlikte *Babesia* merozoitleri ile konak eritrositleri arasındaki moleküler mekanizma, tam olarak bilinmemektedir. *Plasmodium*'da olduğu gibi, ekstraselüler *Babesia* merozoitleri de penetre olacağı eritrositlere tutunmak için hücre yüzeyindeki çeşitli reseptörleri ararlar. *Babesia* merozoitleri, hedef eritrositlere tutunmak için öncelikle yüzeylerinde bulunan surface-coating molekülleri kullanırlar ve etkili bir şekilde hedefe odaklanırlar (95). *Babesia bovis* merozoitleri yüzey kısımlarında VMSA (variable merozoit surface antigen) ailesinde yer alan 5 antijen (*msa-1*, *msa-2a*$_1$, *msa-2a*$_2$, *msa-2b*, *msa-2c*) ihtiva ederler (100). Bu antijenler; amino-terminal hidrofobik bir sinyal bölgesi, hidrofilik merkez bölge ve glikozil-fosfotidilinositol (*GPI*) içeren karboksi-terminal bir uç taşırlar.

Eritrositlere invazyonda kullanılan ikinci ligand ise merozoitlerin roptri ve mikronem proteinleridir (100). Tutunma esnasında *Babesia* türleri apikal organellerinden merozoit yüzeyine veya konak eritrositi içerisine bazı proteinleri salgılarlar. Bu organeller parazitin anterioründe üst kısımda bulunur ve roptri, mikronem ve dense granüllerini kapsar. Özellikle roptri ve mikronemlerden salınan proteinlerin, hücreye invazyonda önemli rol oynadığı düşünülür (101). *Babesia bovis*'te 60 kDa ağırlığında bir roptri proteini (*rap-1*) bulunur. *Rap-1* proteini, konak hücrenin uyarılmasından sorumlu birkaç immunojenik epitopu bulundurur (102, 103). Mikronem ürünü olarak da, apikal membran antijeni-1 (*Ama-1*) (104) ve thrombospondin-related anonymous protein (*TRAP*) (105) molekülleri eritrositlere invazyonda kullanılır. İnvazyonda kullanılan bir diğer molekül ise küresel cisim (spherical

body, 225 kDa) komponentleridir. Özellikle *Babesia* türlerinde apical complex elemanları içerisinde küresel cisim komponentleri bulunur. Bugüne kadar spherical body komponenti olarak üç protein tespit edilmiştir (*sbp-1, sbp-2, sbp3*). Bu proteinler, N- terminal bölgede olduğu farz edilen sinyal peptidlerini içerirler. Parazit, bu peptidleri konak eritrositlerinin içerisine salar (106-108). Apicomplexan parazitlerde, klass XIV filogenetik sınıfında miyozinle ilgili hücresel fonksiyonları yürüten miyozin genleri bulunur (109-111). *Toxoplasma gondii* ve *Plasmodium* spp.'de yaklaşık 10 klass XIV miyozin geni vardır (109, 110, 112, 113). *Neospora caninum, E. tenella, S. muris, C. parvum ve B. bovis*'in de aralarında bulunduğu diğer apicomplexan parazitlerde de kısa miyozin fragmentleri mevcuttur (109). *Babesia bovis*'teki actomiyozin inhibisyonu, *T. gondii* ve *Plasmodium* spp. ile benzerdir (114). Myozin, apicomplexan parazitlerin eritrositlere invazyonunda rol oynar. *Babesia bovis*'te yedi kısa miyozin geni bulunur (*Bbmyo-A, Bbmyo-B, Bbmyo-C, Bbmyo-D, Bbmyo-E, Bbmyo-F, Bbmyo-G*) (109).

Merozoitin eritrositlere invaze olmasında parazite ait reseptörlerin yanında konak eritrositlerine ait reseptörler de rol oynar. Yapılan çalışmalarda sialic asit reziduelerinin parazitler için reseptör görevi yaptığı tespit edilmiştir. Sialik asit rezidueleri N-asetilnöraminik asit (*Neu5Ac*), N-glikolilnöraminik asit (*Neu5Gc*) komponentlerini içerir (115). Bu molekül, sağlıklı insanlarda kolayca tespit edilemezken diğer memelilerde sıklıkla bulunur. Konak eritrositlerindeki diğer molekül ise tripsin veya α-kemotripsin-sensitif proteinlerdir (115). Yapılan çalışmalarda tripsinin *Babesia* türlerinin eritrositlere invazyonunu önemli ölçüde azalttığı ve sadece *B. bigemina*'nın invazyonunu engellediği, *B. divergens*'in ise tripsin ve α-kemotripsin'den etkilenmediği tespit edilmiştir. *Babesia bovis* de bu her iki molekülden etkilenmiş ve invazyonu azalmıştır (116, 117). Bir diğer molekül heparin, merozoitlerin yüzeyine bağlanarak parazitin konak eritrositi içerisine girmesini inhibe eder (118).



Şekil 2.3. *Babesia bovis*'in eritrositlere invazyonu (95)

Heparin, heparan sülfat (HS)'ın sülfatlanmış formu olup kan koagulasyon sisteminin inhibitörü, mast hücreleri ve bazofillerin biosentetik komponentleridir. HS ise daha fazla hücre tipi tarafından üretilen bir alarmindir (119). Dolayısıyla HS proteoglikanları, parazitlerin konak hücre tarafından tanınmasında kullanılır. Sonuç olarak *Babesia* merozoitleri hem kendi komponentleri ve hem de konak eritrositlerine ait komponentler vasıtasıyla eritrositlere invaze olurlar (120, 121).

2.5.2. Eritrositlere Girişin Engellenme Mekanizması

Son yıllarda protein kinaz inhibitörleri ile *Babesia* merozoitlerinin eritrositlere girişinin engellendiği gösterilmiştir. Protein kinazlar; ATP'deki fosfatın, proteindeki aminoasit yan zincirine transferini katalizleyerek ökaryotik hücrelerin çeşitli sinyal yollarında önemli rol oynarlar (122). Bu kinazlar, hücrelerin gelişmesi ve hayatta kalmaları için hayati öneme sahiptir (123). Protein kinazlarının enzimatik aktivitelerindeki en ufak bir aksaklık, kanser, diabet ve kardiyovasküler bozukluklar gibi ciddi hastalıklara yol açabilir (124). *Babesia bovis*'in gelişmesinde sırasıyla serin/threonin protein kinaz, protein kinaz C ve kalsiyum-modulin kinaz'ın inhibitörleri olan straurosporine, Ro-31-7549 ve KN-93'ün etkinliği *in vitro* araştırılmış ve bu inhibitörler arasında strausporine'in en etkili inhibitör olduğu ve parazitemiyi tamamen ortadan kaldırdığı görülmüştür. Bunun yanında 5 mM konsantrasyonda Ro-31-7549 ve KN-93 inhibitörlerinin baskılayıcı bir etki gösterdiği, fakat bunun paraziti

parçalamaya yeterli olmadığı tespit edilmiştir. 0.5-5 mM dozundaki KN-93 inhibitörünün ise parazitin eritrosit içerisindeki gelişimini etkilediği saptanmıştır (125). Öte yandan siklin-bağımlı kinazlar (CDKs) da ökaryotik hücre sikluslarının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. CDK inhibitörlerinin komponentleri olan roskovitin, purvalanol A, CGP74514A ve CDK2 inhibitör II'nin *B. bovis*'in *in vitro* gelişimini önemli derecede baskıladığı; bu komponentlerden roskovitin, purvalanol A, CDK2 inhibitör II'nin *B. bovis*'in intraeritrositik gelişiminin erken safhasını durdurduğu, CGP74514A'nın ise merozoitlerin eritrositlere girişini bloke ettiği tespit edilmiştir (126).

2.5.3. Antijenik Farklılık

Babesia türleri için antijenik varyasyon, konak immunitesinden kurtulma mekanizması olup, farklı bölgelerden elde edilen parazitlerin gen dizilimlerindeki veya gen kümelerindeki değişikliklerden kaynaklanır. Antijenik varyasyon, belki immun konaklara karşı parazitlerin hayatlarını tam olarak idame ettirmelerini sağlamayabilir, fakat heterolog suşlara duyarlılıkta önemli rol oynar (127-129). Bugüne kadar *Babesia* spp. içerisinde en az dört türde; *B. rodhaini* (130, 131), *B. microti* (132), *B. bigemina* (133) ve *B. bovis* (134)'te antijenik varyasyon söz konusu edilmiş ve bunlardan yalnızca *B. bovis*'te *sensu-stricto* antijenik varyasyondan bahsedilmiştir (128, 134, 135). *Babesia* spp.'de bulunan antijen genlerinin birçoğu multigen ailesinde bulunur ve bu genler antijenik varyasyonlarda rol oynarlar. Avustralya'dan elde edilen *B. bovis* suşunda *babR* geni tespit edilmiş (136), daha sonra Meksika'da elde edilen izolatta bu genin bir homoloğu olan *msa-1* ve *msa-2* genleri (137) saptanmıştır. Bu her iki izolatı kodlayan genler akraba olmakla beraber izolatlar arasında çapraz reaksiyon tespit edilememiş ve genler üzerinde bulunan epitopların izolatlara özgü olduğu belirlenmiştir (138). *babR, msa-1* ve *msa-2* genleri bariz bir şekilde homologken, bu genler üzerindeki aktif kromozomal rekombinasyonlar yüzünden DNA mutasyonlu çeşitli alleller oluşmaktadır. Buna bağlı olarak da mRNA, gen boyunca farklı okuma bölgelerine transfer edilmekte ve farklı polipeptid ürünler meydana gelmektedir (137). Bunun yanında bazı allelik genler kalıtsal olabilmekte, parazit antijenlerindeki hızlı değişimlerle alakası olmamaktadır. *Babesia* spp., *T. parva* ve *P. falciparum*'da bulunan *rap-1* genleri, N- terminal ve C- terminal sekans bölgelerinde çeşitli allelik genler taşımalarına rağmen, bu genlerin hızlı antijenik varyasyonlarda rol oynadığına dair bir kanıt yoktur (139-142). *Babesia bovis* VESA (Variable erythrocyte surface antigen) genlerindeki antijenik varyasyon, en az 300 polimorfik kopyaya sahip büyük bir gen ailesindeki gen konversiyonuna bağlı olarak proteinlerdeki

aminoasit farklılıklarından kaynaklanır (128). Buna karşın *rap-1* genindeki antijenik farklılık, daha az sayıdaki aminoasit farklılığından ileri gelmektedir (143).

2.5.4. Babesiosis'te Bağışıklık

Babesiosis'e karşı immunitede, hem sıvısal (humoral) ve hem de hücresel (cellular) faktörler görev alırlar. Parazite konaklık yapan bütün memelilerde ya enfeksiyona maruz kalıp iyileştikten ya da profilaktik bir immunizasyondan sonra (aşılama gibi) *Babesia* türlerine karşı immunite gelişebilir (132, 144). Bununla birlikte bazı *Babesia* türleri, sığırlar için immun baskılayıcıdırlar. Örneğin, *B. bovis* ile enfekte sığırlarda vektör kene *Boophilus microplus* daha iyi kan emebilir. Böylece enfekte sığırlar, enfekte olmayanlara göre daha fazla kene taşır ve dolayısıyla *B. bovis'* in naklindeki etkinlikleri de artar (119). Diğer yandan *Trypanosoma* türlerinde sıklıkla görülen yüzey antijenlerindeki varyasyon, *Babesia* türlerinde de görülür (128, 145). *Babesia* türleri, hayat sikluslarının ilk basamağı olan eritrositlere invazyon aşamasında, konak hücrelerine tutunmak için yüzey kısımlarında bulunan antijenleri kullanır. Bu yüzey antijenlerine karşı meydana gelen antikorlar ise parazitin konak eritrositlerine girişine engel olur (146). *Babesia bovis*, VMSA ailesine bağlı beş [(*msa-1, msa-2a*$_1$*, msa-2a*$_2$, *msa-2b* ve *msa-2c*)]; *B. bigemina* iki (*gp45* ve *gp55*); her iki *Babesia* türü ise ortak bir [rhoptry-associated protein-1 (*rap-1a*, *rap1b*, *rap-1c*)] protein ihtiva eder. Bunların dışında *B. divergens*'de *Bd37*, *B. canis*'de *Bc28* (147, 148) ve *B. gibsoni*'de *P50* (149, 150) genleri bulunur. Merozoit yüzey antijeni tespiti için yapılan tüm çalışmalar aşı geliştirilmesine yöneliktir. Keneler, akarisitlere karşı direnç gösterdiklerinden ilaçlama ile yeterli başarı sağlanamaz (151). Bu yüzden babesiosis'e karşı mücadelede aşılama çalışmaları, çok büyük önem kazanmıştır. Bununla birlikte apicomplexan parazitlerden *Babesia*, *Theileria* ve *Plasmodium* gibi patojenlere karşı etkili rekombinant aşıların geliştirilmesi oldukça zordur. Babesial patojenlerin genomik sekansları, yeni aşı antijenlerinin hızlı identifikasyonuna yardımcı olur. Bu amaçla saha ve laboratuar çalışmaları yapılmıştır (152-154). Diğer taraftan babesiosis tedavisi gören (örneğin imidocarb dipropionate ile) sığırlarda, aynı parazitin homolog suşlarına karşı yıllarca süren direnç görülürken, heterelog suşlara karşı korunmada infeksiyon zorunludur (119, 155). *Babesia* taşıyıcı hayvanların dalağının çıkarılması, hastalığın klinik görülmesi ile sonuçlanır. Bu hastalıkta dalak, sadece antikor üretmez, enfekte olmuş eritrositleri de yok eder (156, 157).

Babesiosis'e karşı dirençte, genetik (örneğin, *B. bigemina'*ya karşı *Bos indicus*, *Bos taurus* sığırlarına göre daha dirençli) (154) ve yaş (80, 158) gibi birçok faktör etkilidir. Yaş direnci

antikordan bağımsızdır (19, 159, 160). Genç danalarda, interleukin 18 (IL-18) ve IL-12 veya *B. bovis* tarafından stimule olmuş ve IL-12 ihtiva eden makrofajları içeren süpernatantlar vasıtasıyla uyarılan splenik doğal öldürücü (NK) hücreler, IFN-γ'yı üretirler (161-163). *Babesia bovis*'e karşı oluşan erken immun yanıtta, IL-12 aracılığıyla NK'lerin uyarılması ve bu hücreler tarafından üretilen IFN-γ ile makrofajların aktive olması, bunların NO üretimi, NO'nun da hücre içi paraziti öldürmesi enfeksiyonu engeller. Böylece kazanılmış immunite gelişir (164-166). Öte yandan babesiosis'e karşı immunitede, patojenle ilişkili moleküler kalıplar (PAMPs) olarak adlandırılan motifleri tanıyan ve bunlarla bağlanabilen, doğal immunitenin uyarılmasını ve takiben kazanılmış yanıtın başlatılmasını sağlayan Toll-like reseptörler (TLR)'den TLR9 ve TLR11 sorumludurlar (167, 168).

Hem sıvısal ve hem de hücresel faktörler babesiosise karşı bağışıklıkta önemli rol oynar (85). Başlangıçta immun sistem, etkili bir "primed" (güçlü immun aktivasyon) kazanır (157). Enfeksiyon konağa bulaştırıldığında sporozoitler, kısa bir müddet dolaşımda plazma içerisinde serbesttirler. Bu aşamada, immunoglobulin G (IgG), sporozoitlerin hedef hücrelere girmesinden önce onlara bağlanıp nötralize ederek enfeksiyonu engelleyebilir. Sporozoitler eritrositlere girdikten sonra ise yeni bir dönem başlar. Bu evrede parazitemi yükselir ve akut babesiosis görülebilir. Doğal immun sistem hücreleri, parazitin gelişme hızını kontrol ederek paraziteminin süresini belirler. Makrofajların ve NK hücrelerin yokluğunda, kısa süre içerisinde yüksek bir parazitemi gelişir. Paraziteminin engellenmesi, çözünebilir faktörlerin üretimiyle gerçekleşir. Bu faktörler; NK hücreler tarafından salınan IFN-γ ve makrofajlar tarafından üretilen TNF-α, NO ve reaktif oksijen türleri (ROSs)'dir. Parazitemideki düşme, parazitlerin dejenerasyonu ve bunların dalak tarafından temizlenmesi ile sağlanır. Bu sırada enfeksiyon çözülme evresine girer ve hastalık şiddetliden sakin döneme geçer. Hastalığın gerileme evresinde, parazitlerin ölümü için T lenfositleri, özellikle de CD4+ (Cluster Designation 4+) ve IFN-γ subpopulasyonları gereklidir (85).

2.5.4.1.Kazanılmış Bağışıklık

2.5.4.1.1. Humoral İmmun Yanıt

Babesia infeksiyonlarında humoral bağışıklığın önemi sınırlıdır (85). Antikorların plazmada serbest haldeki parazitler üzerine olan etkileri, eritrosit içerisindeki parazitlere göre daha fazladır. Bu yüzden, antikorların koruyucu rolleri, parazitlerin kan dolaşımına ulaştıkları zaman ile hedef hücrelere girdikleri zaman arasında geçen süreyle sınırlıdır. Bu evrede IgG'ler sporozoitlere bağlanarak hedef hücrelere girmelerini engellerler. Sporozoitlerin

eritrositlere penetrasyonu, alternatif komplement sistemin aktivasyonunu sağlarken, eritrositlerdeki *Babesia* antijenleri de antikor üretimini teşvik ederler. Antikorlar, eritrositleri opsonize ederek fagositik hücreler (dalak orijinli makrofajlar) tarafından yok edilmelerini kolaylaştırırlar (169). Fagositoz, başlangıçta nonspesifikken ileri dönemde opsonizasyona bağlı olarak spesifik hale geçer (170, 171). *Babesia* türleri, humoral immun yanıtı alt edebilir ve onu kendi yararına göre değiştirebilirler. *Babesia bigemina* enfeksiyonunda, konak eritrosit yüzeyinde bulunan bir parazit proteini IgM'yi bağlar ve bu bağlanma parazitin gelişmesi ve hayatta kalmasında yararlı olur (172). Komplement sistem ile olan ilişkilerde de benzer bir taktik söz konusudur. Komplement ile *Babesia* türlerinin lize edildiği tespit edilememişse de *B. rodhaini*'nin eritrositlere invazyonunda, komplement sistemin çeşitli unsurlarının esas olduğu görülmüştür (96). Ayrıca *B. rodhaini* merozoitlerinin fagositozisini artırmak için komplement kullanılan bir çalışmada komplementin, umulmadık şekilde patojenin fagositozisini inhibe ettiği görülmüştür (173).

2.5.4.1.2. Hücresel İmmun Yanıt

Babesiosis'e karşı dirençte hücresel immunitenin rolü (85), konağın savunma sisteminde dalağın öneminin fark edilmesiyle ortaya çıkmıştır (156). Dalak; T, B ve NK hücreleri ile makrofajların yer aldığı büyük bir lenfoid organdır. Bu hücre populasyonlarının bazıları koruyucu etkiden sorumludurlar. Bağışık hayvanların dalak hücrelerinin, *Babesia* ile enfekte farelere transfer edilmesiyle fareleri enfeksiyona karşı korumak mümkündür (174). Bundan başka, iyi seviyelerdeki korumanın lenf yumrusu hücreleriyle değil de, özellikle dalak hücreleri tarafından sağlanması, sistemik olarak antijenlerin muhtemelen perifer lenf yumruları yerine tercihen dalağa yönlendirildiğini yansıtır (175). T hücrelerinin spesifik rolü, timus-yetersiz hayvanlar kullanılarak araştırılmıştır. Timussuz farelerin *B. microti* ile konjenital enfeksiyonunda, yüksek inatçı bir parazitemiye karşılık normal farelerde geçici parazitemi saptanmıştır (175, 176). Bu veriler, T hücrelerin babesiosis'e karşı dirençte kritik öneme sahip olduğunu ve ayrıca enfeksiyonun çözülme döneminde de T hücre aracılı mekanizmaların rol aldığını gösterir (175). Keza T hücreleri, öldürücü *Babesia* türlerine karşı korunmadan da sorumludurlar. *Babesia rodhaini*'ye karşı bağışık farelerde, antitimusit serum verildiğinde parazitemide yükselme ve yüksek mortalite görülür (177). Öte yandan immun hayvanlardan elde edilen saflaştırılmış T lenfositlerinin infeksiyonla karşılaşmamış (naive) farelere nakli, *B. microti*'ye karşı immunite oluşturmada (175); immun yetersiz farelere immun timusitlerin edinsel transferi ise *B. microti* infeksiyonunu ortadan kaldırma kabiliyeti

kazandırmada yeterlidir (178). *Babesia microti* antijenleri, T hücrelerinin spesifik aktivasyonunu tetikleyebilir. Serbest merozoitlerde olduğu gibi enfekte eritrositler de, fareleri gecikmiş hipersensitivitiye duyarlı hale getirirler (179). CD4+ T hücreleri azalmış farelerin, *B. microti* infeksiyonuna karşı normal farelerden daha duyarlı oldukları; CD8+ sitotoksik T'lerin azaldığı farelerde ise bu duyarlılığın artmadığı, tersine azaldığı ve bu yüzden *B. microti* enfeksiyonuna karşı korumada başlıca sorumlu subpopulasyonun CD4+ T hücreler olduğu ileri sürülmektedir (180, 181). Buna karşın A.B.D.'de hasta bir insandan izole edilen (182), patojenitesi ve öldürme gücü (%100) itibariyle *B. bovis*'e iyi bir model kabul edilen WA1 *Babesia* suşu ile farelerde oluşturulan enfeksiyon, CD8+ T hücrelerince üretilen IFN-γ ve γδT hücrelerince üretilen TNF-α ile karakterize bulunmuştur (183). Öte yandan TNF reseptör yetersiz farelerde WA1 *Babesia* enfeksiyonun daha hafif seyrettiği ve farelerin %90'nın hayatta kaldığı gözlenmiştir. Takiben genetiği değiştirilmiş farelerde (knockout mice) yapılan deneyde, akut WA1 *Babesia* enfeksiyonu gözlenmiş; IL-12, IFN-γ ve NO'in koruyucu rol üstlendikleri; bu enfeksiyonda ne B hücreleri ne de CD4+ T hücreleri immuniteye katkı sağlamazken, NK hücreler ve makrofajlar önemli bulunmuştur. Bu veriler, WA1 *Babesia* suşuna karşı doğal immunutenin, kazanılmış bağışıklığın gelişimi ve enfeksiyonun kontrolünde kritik öneme sahip olan IL-12 ve IFN-γ aracılığı ile makrofaj aktivasyonunu ve NO üretimini kapsadığını gösterir (184).

Genelde immun hücre aktivasyonunun babesiosis'e karşı koruyucu olduğunun görülmesine karşın, bazı güçlü immun hücre populasyonlarının hastalığın patogenezisinde de görev alma olasılığı vardır. Bu olasılık, öldürücü *B. rodhaini* suşu ile challenge edilen immun sistemi baskılanmış farelerin, tedavi edilmeyen immun yeterli (immunocompetent) farelere göre hayatta daha fazla kalmalarıyla desteklenmiştir (185).

2.5.4.2. Doğal Bağışıklık (Nonspesifik İmmun Yanıt)

Babesiosis'e karşı doğal immunite, spesifik olmayan (nonspesifik) komponentler ile sağlanır. Bunun yanında doğal bağışıklıkta, çeşitli spesifik moleküllerin sorumlu olduğu ve özellikle NK hücrelerin ve makrofajların antibabesial aktivitede yer aldığı ortaya konmuştur (186). Makrofaj inhibisyonu (177) veya kaybı (187) *Babesia* türlerine karşı bağışık farelerin korunmasını tümüyle ortadan kaldırır ve yüksek oranda ölümlere yol açar. Tersine, immun hayvanlardan alınan makrofajların transferiyle, önceden patojenle karşılaşmamış (naive) fareleri *B. microti*'ye karşı korumak da mümkündür. Bu koruma, immun T hücrelerin transferiyle sağlanandan çok daha iyidir (174). Spesifik olmayan çeşitli infeksiyon

uyarımlarına cevaben, makrofajların ve NK hücrelerin çözünebilir mediatör üretmeleri, belirleyici özellikleridir. Çözünebilir mediatör üretimi, babesiosis için primer öneme sahiptir. Akut enfeksiyona yol açan WA1 *Babesia* suşuna karşı doğal bağışıklık mekanizmasında, IL-12 ve IFN-γ aracılığı ile makrofaj aktivasyonu ve NO üretimi çok önemlidir (166, 184). Enfekte farelerde makrofajların NO üretimi, parazitin gelişimini durdurur (188). Babesiosis'de bir diğer makrofaj çözünebilir faktör olan TNF-α da paraziti öldürür (189). Ayrıca, *B. bovis*'in eritrosit içi ölümünde ROSs'ın da rolü vardır.

Babesiosis'e karşı doğal immunitede, TLR'lerden CpG (TLR9) ve profilin (TLR11)'nin rolü ortaya konmuştur (85, 166). *Babesia bovis* merozoit ekstraktlarının sığır PBMC (peripheral blood mononuclear cells) proliferasyonunu non-spesifik olarak aktive etmesi TLR9'un varlığından ileri gelir (167). Ayrıca *E. coli*'de olduğu gibi, *T. cruzi*, *T. brucei* ve *B. bovis'*te de aktive makrofajların IL-1β, IL-12, TNFα ve NO üretiminden sorumlu DNA, *B. bovis* lipid ve *Babesia* merozoit ektratlarında da gösterilmiştir (165, 166, 190). Hem sığırlarda TLR9'nin varlığını ortaya koyan çalışmada (168) hem de yukarıda bahsi geçen çalışmalarda (165, 167, 190) TLR9'un fonksiyonel olduğu gösterilmiştir. *T. gondii* ve diğer protozoonlarda identifiye edilen TLR11, IL-12 üretimini sağlayan bir proteindir (191). *Babesia bovis* Texas suşu (T_2Bo)'nun genomik sekansının homolog genleri için yapılan parçalamada, 17.5 kDa'luk profilin benzeri bir protein identifiye edilmiş ve bunun *P. falciparum*, *T. gondii* ve *T. parva* profilleri ile %34-64 identik olduğu saptanmıştır. Ancak, aynı şartlarda ne *Cryptosporidium parvum* ne de recombinant *B. bovis* TLR11'leri, sığır APC (activated protein C)'siyle IL-12 üretimini stimule etmezken; *B. bovis* DNA ve *E. coli* DNA TLR11'leri IL-12 üretimini stimule etmiştir (166, 190). Bugüne kadar sığır genomunda TLR11'in homologları identifiye edilememiştir (166). İlginç olarak TLR11, insan hücrelerinde bulunmadığı gibi (192), kedi, köpek ve şempazenin de aralarında bulunduğu çeşitli memelilerde de (193) exprese edilememiştir. Bu sebeple, protozoon enfeksiyonlarında non-murine memeli immun yanıtında apicomlexal TLR11'lerin rolü halen bilinmemektedir (166).

2.5.5. *Babesia bovis*'in Genomik Yapısı

Parazit genomik sahası, hızlı bir şekilde değişmektedir. Elde edilen genomik bilgilerle kazanılan bu hız, parazit genomiklerinin mevcut durumlarının yalın bir şekilde gözden geçirilmesine olanak sağlamaktadır. Parazit genomları, büyüklük (<10 Mb'tan >5000 Mb'a) ve organizasyon (bir kromozomdan yüzlerce kromozoma) bakımından farklılıklar göstermektedir. Bununla birlikte, parazitlerin filogenetik farklılıklarından kaynaklanan çeşitli

konular da bulunmaktadır. Protozoonlar, büyüklükleri 0,1-5 Mb arasında değişen kromozomları kapsayan küçük genomları içermektedirler (istisna olarak, *Trypanasoma cruzi*'nin genomu, 70 Mb olup en küçük nematodtan daha büyüktür) (194). Apicomplexan parazitler diğerlerine nazaran daha sade genomlara sahiptirler. *Babesia* DNA'sının saptanmasında uygun genetik markerların seçimi çok önemlidir. Kenelerle nakledilen diğer birçok patojende olduğu gibi, *Babesia* genomu da henüz tam olarak sekanslanamamıştır. *Babesia* genomlarının tamamen tespit edilmesi amacıyla çeşitli projeler yürütülmektedir. *Babesia* genomunda rRNA'yı kodlayan 3 gen kombinasyonu bulunur. Bunlar: a) 18S-ITS1-5, b) 8S-ITS2 ve c) 28S'dir. Ribozomun küçük alt ünitesinin rRNA'sını kodlayan 18S rDNA geni, *Babesia* türlerinin teşhis ve epidemiyolojisinde en çok kullanılan gen bölgesidir (194).

Babesia türlerinin, *Plasmodium* spp. ve *Theileria* spp. ile çeşitli benzerlik ve farklılıkları bulunur. Bununla birlikte bu türler arasında tRNA sayısı, metabolik olaylarda anahtar enzimlerin eksikliği, intergenik bölgelerin uzunluğu, gen yoğunluğu ve intron dağılımı gibi genom sekansları açısından da faklılıklar mevcuttur. Büyüklük olarak 8,2 Mbp (Mbp= megabasepairs= million base pairs)'lik genom sekansına sahip olan *B. bovis*, bu açıdan *Theileria* spp. (8,3 Mbp) ile benzerlik gösterir. *B. bovis* ile *Theileria* spp.'nin genom yapıları dikkat çekecek derecede benzerdir (92). Birkaç kromozomal düzenlemeye rağmen yaygın bir sinteni (korunmuş gen dizilimi) mevcuttur. Buna karşın, klinik ve patolojik semptomlar açısından benzerlik gösteren *B. bovis* ve *P. falciparum* arasında ise gen büyüklüğü, gen sayısı ve gen bütünleyicileri açısından büyük farklılıklar bulunmaktadır (Tablo 2.1). *Plasmodium falciparum*'un kromozomal sintenisi mikrobölgelerle sınırlıdır. *Babesia bovis*'in genom sekansı; sitoadezyon, sekestrasyon ve immun yanıtta rol oynayan polimorfik varyant eritrosit yüzey antijen proteini olan *ves1* geninin geniş analizine olanak sağlamaktadır. Aynı şekilde *P. falciparum*'da da *var* genlerinin analizi genom sekansı sayesinde analiz edilebilmektedir (92). 150 *ves1* genleri her bir kromozom boyunca dağılan gruplar içerisinde bulunmakta olup multiple *ves1* sekanslarını ihtiva eden *kromozom-1* üzerindeki fiziksel boşluklar arasında yakınlık açısından bir artış bulunmaktadır. *ves1* grupları farklı eristrosit yüzey antijenlerinin biyolojisinde veya immun yanıtta ya da her ikisinde de rol oynayan *smorf*'dan köken alan variant genlerin yeni bir ailesi ile bağlantılıdır. *Ves1* genleri ile *smorf* genlerinin ilk analizleri çeşitli varyantların tesadüfi transkripsiyonunu göstermektedir (92).

Babesia bovis, dört kromozoma sahiptir. En küçük kromozom olan *kromozom-1* üzerinde çeşitli büyüklüklerde contig (genom üzerindeki bitişik segment) içeren fiziksel boşluklar

bulunur. *Kromozom-2* ve *kromozom-3* tamamen sekanslanmış (1.729.419 bp ve 2.593.321 bp); *Kromozom-4* üzerinde de çeşitli büyüklüklerde contig'ler bulunur (195). *Babesia bovis*, 8,2 Mbp büyüklüğünde olup *T. parva* (8,3 Mbp) ve *T. annulata* (8,35 Mbp) ile büyük benzerlik gösterir. Her bir *B. bovis* kromozomu A+T açısından zengindir. İlk üç kromozom akrosentrik iken *kromozom-4* submetasentriktir. *Babesia bovis* genomu üç rRNA segmenti içerip bunlardan ikisi *kromozom-3* diğeri de *kromozom-4* üzerindedir. Ayrıca bütün kromozomlar üzerinde toplam 44 tRNA geni bulunur (196-198).

Babesia bovis'in metabolik profili, *P. falciparum*'dan çok *Theileria* spp. ile benzerlik gösterir (Tablo 2.1). *Plasmodium falciparum*, piruvat dehidrojenazı kodlarken *B. bovis* ve *Theileria* spp. bunu kodlamamaktadır. Pürin bazlarının düzenlenmesinde rol oynayan hipoksantin-guanin fosforibosil-transferaz (HGPRT) enzimleri *P. falciparum*'da mevcut iken *B. bovis* ve *Theileria* türlerinde bu enzimler mevcut değildir. *Babesia bovis*, iki adet adenozin kinaz enzimini kodlarken bu enzim *Theileria* türlerinde yoktur. *Plasmodium falciparum* ise adenozin deaminaz enzimlerini kodlamaktadır (197-199). *Babesia bovis*, diğer apicomplexan parazitler arasında en küçük membran transporterlarına sahip olanıdır. Fakat diğerlerine göre daha fazla bölgeyi kodlamaktadırlar (örn. glikoz-6-fosfat ve fofat/fosfoenolpiruvat translokatörleri, ilaç/metabolit transporter ailesinin üyeleri vb.). *Theileria parva*'ya göre daha az ABC effluks proteinini kodlamaktadır. Her ikisinde de aquaporinler, kalsiyum: katyon antiporları ve aminoasit permeazları yokken, *P. falciparum*'da bunlar bulunmaktadır (197, 200).

Apicomplexan birçok parazit plastid benzeri bir organel olan apicoplast'ı ihtiva eder. Apicoplastlar, parazitler için hayati bir organel olup yokluğunda ilaçlara karşı direnç azalır. Bunlarda bazı metabolik olaylar gerçekleşir (92, 201). *Babesia bovis* apicoplast genomu, 33 kbp büyüklüğünde olup 32 putative proteini kodlar. *Babesia bovis* apicoplastı; büyüklük, gen içeriği ve dizilimi açısından *E. tenella, P. falciparum, T. parva* ve *T. gondii* ile benzerlikler göstermektedir. *Babesia bovis*'in apicoplast genomu (%78,2), nüklear genoma (%58,2) göre daha fazla A+T içermektedir (92, 202-204).

Babesia bovis, 6 kbp büyüklüğünde mitokondriyal genoma sahiptir. Bu genom, sitokrom-c oxidase subunit-I, III ve sitokrom-b'yi içeren protein kodlayıcı üç putative geni kodlar. Bu proteinler, membran bağlayıcı proteinler olup mitokondriyal solunum zincirinde görev alan enzimleri oluştururlar. Sitokrom-b ve sitokrom-c subunit-III aynı zincirde kodlanırken, sitokrom-c subunit-I ise karşı zincir üzerinde kodlanır. Bu kodlama dizilimi *Theileria* spp. ile

benzerken *P. falciparum*'da farklıdır. Her bir kodlanan protein üniversal başlangıç kodonu olan ATG'yi bulundururken, *T. parva* sitokrom-c subunit-I, farklı olarak AGT başlangıç kodonuna sahiptir. Bunlara ilaveten *B. bovis* mitokondriyal genomu, büyüklükleri 34-301 bp arasında değişen beş tRNA genini bulundurur. Bu beş tRNA sekansı da rRNA'nın büyük alt ünitesinin homoloğudur (197, 198, 205).

Kısaca özetlemek gerekirse; *Babesia* türlerinden *B. bovis*'de yüzey proteinleri; *msa-1*, *msa-2a*$_1$, *msa-2a*$_2$, *msa-2b*, *msa-2c*, *B. bovis P0* ve salgı proteinleri; *rap-1*, *ama-1*, *TRAP*, *sbp-1, sbp-2, sbp-3*'dür (100, 147, 150). *Babesia bigemina*'da yüzey proteinleri; *gp45, gp55, BbiP0* ve salgı proteinleri; *rap-1a, rap-1b, rap-1c*'dir (150, 206). *Babesia divergens*'te yüzey antijeni *Bd37* ve salgı antijeni *rap-1* (207); *B. canis*'te yüzey antijeni *Bc28* ve salgı antijeni rap-1 (148); *B. gibsoni, B. caballi ve B. equi'*de sırasıyla yüzey antijeni olarak *BgP0, BcP0* ve *BeP0* (150) bulunmaktadır.

Tablo 2.1. Bazı apicomplexan protozoonların genomik karakterleri (92)

Özellikler	**Türler**		
	P. falciparum	*T. parva*	*B. bovis*
Büyüklük (Mbp)	22.8	8.3	8.2
Kromozom Sayısı	14	4	4
Toplam G+C dağılımı (%)	19.4	34.1	41.8
Apicoplast genom büyüklüğü (kbp)	35	39.5	33
Mitokondriyal genom büyüklüğü (kbp)	~6 linear	~6 linear	~6 linear
Nüklear protein kodlayan gen sayısı	5,268	4,035	3,671
Protein kodlayan genin ortalama uzunluğu (bp)[a]	2,283	1,407	1,514
İntronlu gen yüzdesi	53.9	73.6	61.5
Intergenic bölge uzunluğu (bp)	1,694	405	589
Intergenic bölgenin G+C dağılımı	13.8	26.2	37
Exonların G+C dağılımı (%)	23.7	37.6	44
İntronların G+C dağılımı (%)	13.6	25.4	35.9
Kod yüzdeliği	52.6	68.4	70.2
Gen yoğunluğu[b]	4,338	2,057	2,228

[a]İntron içermez, [b]protein kodlayan genlerin genom büyüklüğü/sayısı.

2.5.6. *Babesia bovis*'in Transkripsiyon Mekanizması

Prokaryotikler, DNA bağımlı bir tek RNA polimeraz (RNA pol)'a sahipken, ökaryotik organizmler çekirdekte, RNA sentezinde her biri farklı bir fonksiyon gösteren üç enzimi barındırırlar. Bunlardan RNA pol I, sadece büyük ribozomal (r) RNA gen ünitesini (rDNA)'yı kopyalar; RNA pol II, mRNA'yı sentezler ilave olarak çeşitli küçük RNA'ları örneğin U1-U5 küçük nükleer (sn)RNA'ları sentezler; RNA pol III, tRNA'ları, 5S rRNA, ve U6 snRNA'yı içeren diğer küçük RNA'ları sentezler. Ökaryotik RNA pol'lar, 12 veya daha fazla farklı polipeptidden oluşan çoklu alt birime sahip enzimlerdir. En büyük olan alt ünite yaklaşık 160-

220 kDa; ikinci büyük alt birim 115-135 kDa; üçüncü polipeptid ise yaklaşık 40 kDa büyüklüğünde olup enzimin etkin alt birimlerini temsil ederler. Bunlar, prokaryotik pol I domainleri ile homolog, yüksek seviyede korunmuş sekans motiflerini ihtiva ederler ve tahminen enzimin aktif merkezini oluştururlar. Diğer alt üniteler ya özel bir RNA pol I için spesifiktirler ya da iki veya her üç enzim için geneldirler (208).

Ökaryotik RNA pol'lar, spesifik DNA sekans motiflerini tanıyamazlar ve kendi kendilerini kusursuzca kopyalayamazlar. Doğru kopyalamanın başlatılabilmesi için, yardımcı faktörlere ihtiyaç vardır. Yardımcı olarak, promoter sekansları üzerine toplanma ve RNA pol sıralamasıyla kalıcı bir kopyalama başlangıç kompleksi şekillenir. Her bir RNA pol, bir seri spesifik kopyalama faktörleri ile interaksiyona girer ve böylece karakteristik promotor yapılarına dayanır. Bundan dolayı ökaryotik genler; class-I, class-II veya class-III genler olarak ayrılırlar. Bazı faktörler, farklı sınıflara ait genlerin kopyalanmasına katılırlar. Bu faktörlerin her zaman en önemli örneği, TATA box bağlama proteini (TBP)'dir. Değişik multi-subunit kopyalama faktörü olarak görev yapan bu polipeptit, üç RNA pol'ünün tamamının kopyalanmasının başlatılması için önemlidir. Yardımcı faktörler ve RNA pol'ün fonksiyonel bir promotor ile bağlanması, bazal seviyede doğru bir kopyalamayı başlatarak genel veya temel kopyalama mekanizmasını oluştururlar (208). Ayrıca, kopyalamanın başlangıç seviyesinde, değişik regulatör grupları ve kofaktörler tarif edilmiştir. Çekirdekte, DNA kromatin olarak organize olur ve histonlarla oluşturulan nükleozomal yapı, genel bir kopyalama engelleyicisidir. Çünkü bu yapı, promotor bölgesi ile temel transkripsiyon mekanizması arasındaki iki taraflı etkiye mani olur. Dolayısıyla etkili bir kopyalamanın başlatılabilmesi için kromatin kalıplarında, kromatinin yeniden yapılanması esastır. Transkripsiyonun başlamasından sonra RNA pol yardımcı faktörlerden kurtulur, promotordan kaçar ve transkripsiyon uzatma kompleksi içine transforme olur. Daha sonra, kopyalama sonlandırma sinyali gelinceye kadar devam eder. Her RNA pol'ın kendine özgü sinyali ve sonlanma modeli vardır. RNA pol-III, *trans*-acting faktöründen bağımsız olarak 4 ile 7 T'lik kalıntılarla sonlanır. Buna karşılık, class-I genlerinin sonlanma determinantları, bir protein faktörü ile bağlanır, bu da özellikle RNA pol-I ile etkileşime girerek kopyalamayı bozar. RNA pol-II transkripsiyonunun sonlandırılması, iyi karakterize edilmemiş olmasına rağmen G'ce zengin sekansları gerektirir ve mRNA'nın sentezinde RNA poliadenilasyon ile eşleşmiş olduğu görülür (208).

Promotor, transkripsiyonun başlangıç noktasını tayin eden RNA polimeraz enziminin bağlanma bölgesi veya gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde kontrol noktası görevi yapan 5' ucuna doğru olan DNA kısmının bir regulatör bölgesi olarak tanımlanır (208). Translasyon; translasyon (protein yapımı) üç aşamada gerçekleşir. Bunlar: (i) başlama (initasyon), (ii) uzama (elongasyon) ve (iii) sonlanma (terminasyon). Bazı protein faktörleriyle birlikte mRNA, tRNA ve ribozomlar translasyon için gereklidir. Enerji ise GTP (Guanozin trifosfat)'den sağlanır. (i) Transkripsiyon için, DNA çift sarmalının sadece bir iplikçiği gereklidir. Bu iplikçiğe kalıp iplikçik denir. Transkripsiyonun başlangıç noktasını tayin eden RNA polimeraz enzimi, DNA üzerinde promotoru tanır ve ona bağlanır. Bağlanmayı takiben DNA iplikçikleri açılmaya başlar. (ii) İkinci aşama uzama safhasıdır. Bu safhada, ayrılan DNA iplikçiklerinin her birinin karşısına RNA polimeraz vasıtasıyla mRNA kopyalanır. (iii) Üçüncü aşama sonlanma aşamasıdır. Bu evrede yeni sentezlenen mRNA'nın sitoplazma ve endoplazmik retikulum dahil birçok hücre bölgesine ulaşması için değişikliğe uğraması gerekir. Yıkılmasını önlemek için mRNA'ya 5' *cap* eklenir. Kalıp olmak ve daha sonra işlenmesini sağlamak için 3' ucuna bir poly-A kuyruğu eklenir. Ökaryotlardaki hayati önem taşıyan bağlanma bu aşamada gerçekleşmektedir (208).

Babesia parazitleriyle ilgili olarak yapılan çalışmalarda parazitlerden elde edilen *rap-1* genleri arasında intergenic (IG) bölgelerin bulunduğu saptanmıştır. Bu IG bölgelerin *rap-1* genini düzenlediği hipotez edilmiştir. *Babesia bovis*'in *rap-1* geninin 5' ucunda iki gen bölgesini birbirinden ayıran IG alan bulunmaktadır. Buna karşın *B. bigemina*'da *rap-1* bölgesi en az 5 polimorfik *rap-1a* gen bölgesi içermektedir. Bu bölgenin karakteristik yapısı tam belli olmamakla beraber 3.38 kb'lık bir ağırlıkta olduğu saptanmıştır. *Babesia bovis*'in Mo7 biyolojik suşundan elde edilen DNA'nın PCR ile amplikasyonu sonucu, *rap-1* geninin 3' sekansını kodlayan bir genomik klon, 1 kb'lık IG alan ve 5' sekansını kodlayan ikinci bir gen elde edilmiştir. Bunu takiben *B. bigemina rap-1a* genlerinde iki farklı IG bölge (IG-1 ve IG-2) saptanmış olup IG-1'in ağırlığı 0.7 kb ve IG-2'nin ağırlığı 1.3 kb olarak sekans edilmiştir. *Babesia bovis, B. bigemina, B. ovis ve B. canis*'den elde edilen *rap-1* IG bölgelerinin sekans analizleri yapıldığında *rap-1*'in 5' ucunda en az 3 putatif regülatör bölge olduğu tespit edilmiştir. *rap-1*, IG bölgesinin fonksiyonel bir promotor olup olmadığını saptamak amacıyla *B. bovis*'ten elde edilen 1 kb'lık IG bölgesi "*cat*" geni içeren bir plazmide klonlanmıştır. 5' yönünden 3' yönüne doğru olan IG bölge, güçlü şekilde traskripsiyonu başlatmıştır. Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile 5' ucundaki *rap-1* genleri, bu genler arasındaki IG bölgeler ve 5' yönünden 3' yönüne doğru olan promotor fonksiyonu, *rap-1* geninin düzenlenmesinde IG'nin

önemli rol oynadığı kanaatine varılmıştır (209). Suarez ve ark. (210) yaptıkları bir diğer çalışmada *Babesia rap-1* gen ailesindeki üyelerinin, parazitin bütün yaşam dönemlerinden eksprese edildiğini ve bunların transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmalar ile düzenlendiğini ileri sürmüşlerdir. Bütün *Babesia* türlerinde ard arda gelen *rap-1* gen bölgeleri, IG bölgeler ile bölünmektedir. Suarez ve ark. (210)' nın yaptığı bu çalışma, *B. bovis rap-1* IG bölgesinin, merozoitlerden elde edilen ekzojen genlerin ekstrakromozal ekspirasyonunu başlatıp başlatmadığı ve *rap-1* bölgesine benzer şekilde IG bölgelerin ard arda sıralanmasının ekzojen genlerin ekspirasyonunu artırıp artırmadığını saptamak amacıyla yapılmıştır. Diğer yandan, lusiferaz genlerin ekspirasyonu yapılarak *B. bovis*'in elektroporasyon durumu saptanmıştır. *Babesia bovis rap-1* IG bölgelerinin kontrolü altında, hem *B. bovis*'in elektroporsiyonu hem de luciferase genleri içeren plasmidin nakledildiği *E. coli*'nin luciferası eksprese edebildiği görülmüş ve bundan yola çıkarak *rap-1* IG bölgenin fonksiyonel bir promotor içerdiği tespit edilmiştir.

B. bovis rap-1 bölgesinin kromozomal dizilimi, baştan sona doğru bir *rap-1* gen bölgesi ve ardından bir IG bölge şeklinde oluşmaktadır. *Luc* ve *hdhfr* genlerinin ekspresyonunu kontrol eden iki *rap-1* IG bölgesini içeren plazmide, genlerin baştan başa veya baştan uca doğru olan sıralamasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır. Genler baştan uca doğru sıralandığında lusiferaz seviyesinde diğerine göre artış olduğu görülmüştür (211). Bu sonuçlar, *B. bovis*'in *rap-1* IG bölgelerinin *in vivo* olarak ekstrakromozomal gen ekspirasyonunu başlatarak *B. bovis*'ten eksojen genlerin elde edilmesinin gösterildiği ilk çalışmadır. Suarez ve ark. (209) ökaryotik proteinlerin translasyonunda anahtar bir element olan *elongation faktör 1-α* (*ef-1α*) promotorunu rapor etmişlerdir. Yüksek traskripsiyon potansiyeline sahip *ef-1α* promotorunun enfekte hayvanlardan eksojen genlerin elde edilmesinde kullanıldığını bildirmiş olup; yaptıkları çalışmada sığır babesiosis'ne sebep olan *B. bovis'*in *ef-1α* lokusunun karakterinin saptanması ve *ef-1 α* promotorunun transkripsiyon aktivitesinin ölçülmesi amaçlanmıştır. *Babesia bovis*'in *T2Bo* suşunun *ef-1α* lokusu, 260 bp'lik bir terminal bölge içeren 1.4 kb'lık bir IG bölge ile ayrılan ve uçtan uca dizilim gösteren iki *ef-1α* (A ve B) geni içermektedir. Her iki gen de 448 aminoasit kodlamakta olup hesaplanan molekül ağırlıkları 49 kb'dir. IG bölge, her iki genin ekspirasyonunu başlatmaktadır. Hem *ef-1α A* geninin Ig-A içeren 730 bp'lik ucu hem de *ef-1α B* geninin Ig-B içeren 720bp'lik ucu lusiferaz aktive etmektedirler. 5'-3' diziliminde Ig-B fragmenti en yüksek lusiferaz aktivitesini göstermektedir. Bu fragment çok güçlü bir promotor içermektedir. Analiz sonuçlarına göre her iki *ef-1α* geni de merozoitler içerisinde kopyalanır. Bu çalışma ile elde edilen önemli bir bulgu ise; diğer intraeritrositer

parazitlerin aksine, *B. bovis ef-1 α* lokusunun 5' ucunda 160 bp'lik bir intron bölge bulunmasıdır. Sonuç olarak promotorların hem veteriner hem de tıbbi parazitoloji alanında önemli parazitlerin yaşam döngülerinde gizli kalmış kısımların belirlenmesi, patojenitede önemli rol oynayan faktörlerin sentezlenmesinde görevli bölgelerin keşfi ve bu yolla parazitlerin patojenitelerinin azaltılması veya ortadan kaldırılarak zararsız hale getirilmelerinde önemli olacakları şüphesizdir.

2.5.7. *Babesia bovis*'in Metabolik Özellikleri

Apicomplexan protozoonların çoğu kompleks hayat siklusu boyunca önemli morfolojik ve fizyolojik değişikliklere uğradığından gelişimlerinin belirli aşamalarında enerji ihtiyaçlarını farklı şekillerde karşılarlar. Bazı parazitler, glikolitik yollarının yanında polimerize şekerler şeklinde (örn. amilopektin) enerji depolama yetenekleri yönünden de farklılıklar gösterirler. Biyokimyasal çalışmalar bazı parazitlerin ise polisakkarit ya da yağ asidi formunda enerji depolarına sahip olmadığını, temel enerji kaynağı olarak ekstrasellüler heksozları kullandıklarını göstermiştir (92).

Apicomplexan protozoonların eritrosit içerisinde canlılıklarını sürdürebilmeleri, konak hücresinin sitozolünde ve plazma membranında oluşturdukları modifikasyonlara bağlıdır. Apicomplexan bir parazit olan *B. bovis* ile enfekte sığır eritrositlerinin glikoza karşı geçirgenliği, enfekte olmayanlara göre çok artar (212, 213). Heksozların enfekte hücre içine girişinin doyurulamayan kanal/por benzeri mekanizma (non-saturable channel/pore-like mechanism) ile gerçekleştiği ileri sürülmektedir. Ancak bu yolun moleküler detayları henüz bilinmemektedir. Öte yandan, heksozların eritrosit hücresine girişinin doyurulabilir Na^+-bağımsız heksoz taşıyıcıları aracılığı ile de gerçekleştiği öne sürülmektedir. *Babesia bovis* genomunda BboHT1 ve BboHT2 olmak üzere iki heksoz taşıyıcısı bulunur. Glikozun yanı sıra fruktozu da taşıyan BboHT1'in D-glikoza oranla D-fruktoza affinitesi düşüktür. BboHT1 üzerinde yürütülen radiotracer çalışmalar, BboHT1'in doyurulabilir, Na^+-bağımsız stero-spesifik bir heksoz taşıyıcısı olduğunu ortaya koymuştur. *Babesia* suşları arasında BboHT1 ve BboHT2'nin nükleotid sekansı yönünden farklılık bulunduğu; BboHT2'de daha fazla olan bu farklılıkların fonksiyonel olarak önemli rezidülerde olmadığı saptanmıştır. BboHT1 ve BboHT2'nin orthologları *B. bigemina*'nın genom sekansında bulunur. BboHT1'in aminoasit sekansının insan (GLUT1) ve *P. falciparum* (PfHT) heksoz taşıyıcıları ile sırasıyla % 40 ve % 47 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu benzerlikler, glikozun parazit membranının dış yüzeyine bağlanması gibi heksoz transportu açısından önemli fonksiyonlar ile ilgili korunmuş

kalıntıları veya motifleri kapsar. Bu motiflerden GRR/K, transmembran segment II ile III'ü ve VIII ile IX'u birbirine bağlayan hidrofilik halkalarda (looplarda) bulunur (214).

Babesia bovis, sekansı belirlenmiş olan apicomplexan türleri içerisinde membranında en az taşıyıcıya sahip olan tür olmasına rağmen, diğer türlere göre aynı gruptan olan taşıyıcıları (örn. glikoz-6-fosfat/fosfat ve fosfat, fosfoenolpiruvat translokatörleri, ilaç/metabolit taşıyıcısı) daha fazla kodlamaktadır. *Babesia bovis*, ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı superfamilyasında bulunan ve fizyolojik bariyer olarak görev yapan ABC efflux proteinlerinin çok azını kodlarken, diğer apicomplexan protozonlarda ve *T. parva*'da bulunmayan bir katyon diffüzyon kolaylaştırıcı protein de dahil inorganik katyon taşıyıcılarını daha fazla kodlamaktadır. Öte yandan, *B. bovis* ve *T. parva*'da aquoaporinler, kalsiyum: katyon antiporterlar ve permeazlar yoktur. Faklı tipteki aminoasit taşıyıcısı orthologları *B. bovis*'de identifiye edilememiştir (92).

Plasmodium ve *Toxoplasma* gibi parazitofor vakuole sahip parazitlerin aksine *Theileria* ve *Babesia* invazyondan hemen sonra *Theileria* türleri lenfositlerin, *Babesia* türleri ise eritrositlerin sitoplazmasında serbestçe çoğalırlar ve konağın besin maddelerine doğrudan ulaşabilirler. Besin maddelerine kolay ulaşmaları, genomlarında değişikliğe neden olarak, bazı metabolik yolların (örn. yağ asidi biyosentezi) kaybolmasına yol açar (215).

Babesia bovis; glikoliz, TCA siklusu, oksidatif fosforilasyon, *de novo* primidin biyosentezi, gliserolipid ve gliserofosfolipid metabolizması, pentoz fosfat yolu ve nükleotid interkonversiyonu dahil pek çok metabolik yola sahiptir (92).

2.5.7.1. Karbonhidrat Metabolizması

Apicomplexan protozonlar, temel enerji kaynağı olarak konağın heksozlarını kullandıklarından enfeksiyon sırasında konağın da glikolizinde artış olur (92, 216). *Babesia bovis* ile enfekte eritrositlerde, enfekte olmayanlara göre glikoz ve oksijen tüketiminin 2,5 kat, piruvat üretiminin ise 7 kat arttığı ve ATP sentezinde önemli bir artış olduğu saptanmıştır (217). Konağın aktivitesindeki artıştan parazitin metabolik faaliyetlerindeki artış sorumludur.

2.5.7.1.1. Glikoliz

Apicomplexan parazitler yaşamlarını sürdürebilmek için karbondioksit (CO_2)'e gereksinim duyarlar. Bu parazitler aminoasit ve karbonhidrat metabolizması ara maddelerinin üretimi için CO_2'i fikze etme yeteneğine sahiptirler (218). *Babesia bovis*'in olası metabolik profili *Theileria'*ya benzemektedir. *Babesia bovis*'de piruvat dehidrojenaz, akonitaz ve kompleks

I'in hemen tüm üyelerinin E1 alt ünitesini kodlayan expressed sequence tag (EST)'lar olmadığı için piruvat dehidrojenaz (PDH) enzim kompleksi yoktur. Piruvat dehidrojenaz enzim kompleksi, piruvik asitin asetil CoA'ya dekarboksilasyonunu sağladığından, bu enzimin yokluğu sonucu glikoliz ve TCA arasındaki klasik bağlantı (asetil CoA+okzalasetat) *B. bovis*'de bulunmaz (215, 219). *Theileria parva* şizontlarında transkiripsiyonu en fazla olan genler arasında üçüncü sırada yer alan gen, laktat dehidrojenaz genidir. Bu da bu organizmlerde glikolizin temel son ürününün laktat olduğunu göstermektedir. Aynı durum *B. bovis* için de geçerlidir (218). Piruvat dehidrojenaz enzim kompleksi bulunmayan apicomplexan parazitlerde asetil-CoA'nın kaynağı ile ilgili çeşitli hipotezler vardır. Bazı apicomplexan türlerde asetil-CoA'nın piruvik asitin dekarboksilasyonu ile oluştuğu, bazılarında ise dallanmış zincirli aminoasit transaminaz (BCAT) ve takiben dallanmış zincirli ketoasit dehidrojenaz kompleksi ile konak hücredeki dallanmış zincirli aminoasitlerden (BCAA) sağlandığı düşünülür. Ancak, *Babesia*'da BCAT olmaması, asetil CoA'nın bu yoldan da sağlanmadığını gösterebilir (215). *Toxoplasma gondii*'de konaktan sağlanan glikozun piruvata metabolize edilmesini sağlayan glikolizin tüm enzimlerinin sitozolde; trioz fosfat izomerazın izoformlarının, fosfogliserat kinaz ve piruvat kinazın apicoplastta bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca *T. gondii* genomunun bir tek piruvat dehidrojenaz kompleksini kodladığı ve mitokondride bulunmayan bu kompleksin apicoplastta bulunduğu ileri sürülmüştür. Bu parazitte metabolitlerin sitozol ile apicoplast arasındaki değişiminin, muhtemelen, apicoplastta bulunan bir fosfat translokatör (PT) aracılığıyla olduğu bildirilmiştir. *Babesia bovis*'de bir adet PT saptanmıştır. Piruvat dehidrojenaz kompleksinin mitokondride değil de apicoplastta bulunması, asetil-CoA gerektiren metabolik yollar yönünden önem taşır. Asetil CoA, üç farklı kaynaktan sağlanabilir. Bunlar; piruvat, asetat ya da sitrattır (220). Apicomplexan parazitlerde, fosfofruktokinaz (PFK)'ın ATP ya da pirofosfat (PPi) kullanmasına bağlı olarak, glikoliz ile bir molekül heksozun yıkımlanmasıyla iki veya üç molekül ATP üretilir (215).

2.5.7.1.2. Mitokondri

Generik ökaryotik bir hücrenin (örn. memeli fibroblastının) sitoplazması çok sayıda mitokondriye sahipken apicomplexan parazitlerin çoğu sadece bir tane mitokondriye sahiptir. Tübüler bir yapıya sahip olan bu mitokondrinin şekli, görüntüsü ve kristalarının boyutu parazitin türü ve yaşam siklusundaki basamağına göre değişir. Mitokondri ve apicoplast fiziksel olarak benzerlik gösterir (215, 221). Klasik olarak mitokondri hücrenin enerji santralı

olarak görülür. Aerobik mitokondride, ATP üretimi için karbon kaynakları okside edilir. Mitokondriler, fonksiyon gösterebilmek için oksijene gereksinim gösterirler ve piruvatın asetil CoA'ya oksidatif dekarboksilasyonu için piruvat dehidrogenaz (PDH) kompleksini kullanırlar. Böylece piruvat en sonunda TCA siklusu ile tamamıyla CO_2'e okside olur. Çeşitli düzeylerdeki anaerobik ortamlara adaptasyon sırasında mitokondrilerin fonksiyonlarında büyük farklılaşmalar olur (215, 221, 222).

2.5.7.1.3. Trikarboksilik Asit (TCA) Siklusu

Apicomplexan protozoonlarda TCA siklusu mitokondride gerçekleşir. Ancak bu organelin enerji üretimindeki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. *Cryptosporidium* hariç apicomplexan protozoonlarda TCA siklusu enzimlerinin tümünün genleri mevcuttur ve bu enzimlerin çoğunun mitokondriyal enzimler oldukları kanıtlanmıştır. Aerobik hücrelerde, enerjinin büyük bölümü oksidatif fosforilasyon ile birlikte TCA siklusunda sentezlenir. TCA siklusu, aminoasit ve hem gibi çeşitli hayati moleküllerin prokürsörlerinin kaynağıdır. Fakat apicomplexanlarda TCA siklusunun bu metabolik yollara ne ölçüde katkısı olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir (215, 219). Bazı *Babesia* türlerinde (*B. bovis*, *B. bigemina* ve *B. microti*), glutamat'ın α-ketoglutarat'a oksidasyonunu katalizleyen glutamat dehidrojenaz (GDH) enziminin bulunduğu; glutamatın TCA siklusu aracılığı ile metabolize edilerek parazit için bir enerji kaynağı oluşturabileceği bildirilmiştir (223, 224).

2.5.7.1.4. Oksidatif Fosforilasyon ve Elektron Transport Zinciri

Aerobik mitokondriler ATP formunda hücresel enerji üretmek için karbon kaynaklarını okside ederler. Bu olay oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılır (215). Klasik elektron transport zinciri; NADH dehidrojenaz (kompleks I), süksinat dehidrojenaz (kompleks II), ubiquinon (koenzim Q), sitokrom bc_1 oksidoredüktaz (kompleks III), sitokrom c ve sitokrom oksidaz (kompleks IV)'dan oluşur. Proton nakli; kompleks I, III ve IV'de gerçekleşir ve bu arada ATP sentezlenir (221, 225).

Apicomplexan parazitlerde elektron transport zinciri kısmen mevcuttur ve oksijen tüketebilir. Bu parazitlerin mitokondrisinin genomunda bulunmayan mitokondriyal proteinler nükleusta kodlanır, sitoplazmada translasyona uğrar ve translasyon sonrasında organele alınır (221). Altı kbp'lik bir linear mitokondriyal genom içeren *B. bovis,* sitokrom C oksidaz alt ünite I, III ve sitokrom b olmak üzere üç proteini kodlayan geni kodlar. Bunlar membran bağımlı

proteinlerdir ve mitokondriyal solunum zinciri ile ilişkili enzim kompleksinin parçasıdırlar (92).

Çeşitli koenzim Q (CoQ) redüktazlar, dehidrojenazlar veya mekik sistemleri, elektronların ubiquinon aracılığıyla iç membrandaki kompleks III'e taşınmasını sağlar. Apicomplexan parazitlerde bu tip beş enzim kodlanmaktadır. Multi enzim kompleks I bulunmadığında tip II alternatif NAD(P)H oksidoredüktaz'ları kodlayan genlerin bulunduğu saptanmıştır. Bu genlerin iç membranın dış yüzeyinde lokalize oldukları tahmin edilmektedir. Diğer CoQ oksidoredüktazlar [dihidrooratat dehidrojenaz (DHOD) ve gliserol-3-fosfat (G-3-P) dehidrojenaz] sitozoldeki redükte bileşiklerden elektron transfer ederken süksinat: quinon dehidrojenaz ve malat:quinon oksidoredüktaz TCA siklusu'nda üretilen elektronları taşır (215, 219).

Babesia bovis'de F-tipi ATPase enziminin expresyonu çok fazladır. Membrana bağlı bir C alt birimi ile katalitik aktivite gösteren CF alt biriminden oluşan bu enzim membranlarda transportu sağlar. *Babesia bovis'*de gliserol-3-fosfat (G-3-P) dehidrojenaz sentezinin fazla olması bu protozoon ile *P. falciparum* ve *T. gondii* arasındaki önemli bir farklılıktır. Parazitin eritrosit içerisindeki döneminde, mitokondri iç membranında bulunan flavin adenin dinükleotid (FAD) bağımlı G-3-P dehidrojenaz ve sitozolik NAD bağımlı G-3-P dehidrojenaz muhtemelen bir G-3-P mekiği oluşturur. Bu mekik, indirgenmiş ekivalanların sitozolik NADH'dan mitokondri matriksindeki $FADH_2$'e transferini sağlayarak sitozolik $NADH/NAD^+$ oranını kontrol eder. NAD bağımlı sitozolik G-3-P dehidrojenaz, NADH kullanarak dihidroksi aseton fosfat (DHAP)'ı G-3-P'a indirger. Böylece mitokondri iç membranına kolayca giren G-3-P, FAD bağımlı G-3-P dehidrojenaz tarafından FAD'in $FADH_2$'e indirgenmesiyle tekrar DHAP'a dönüşür (219).

Babesia spp. dahil bazı apicomplexan protozonlar için önerilen elektron transport zinciri modelinde; elektronlar, sırasıyla Tip II alternatif NAD(P)H oksidoredüktaz (alternatif kompleks I), süksinat dehidrojenaz (kompleks II), malat:quinon oksidoredüktaz, dihidrooratat dehidrojenaz ve gliserol-3-fosfat mekiği ile toplanır ve ubiquinol oluşturmak üzere koenzim Q'ya transfer edilirler. Daha sonra elektronlar, ubiquinol'den Q-sitokrom c oksidoredüktaz (kompleks III)'a transfer edilir. Buradan da bir sonraki elektron alıcısı olan sitokrom c'ye transfer edilen elektronlar, su oluşturmak üzere moleküler oksijeni indirgeyen sitokrom c oksidaz (COX, kompleks IV)'a aktarılır. Kompleks I, III ve IV elektron transferinden sağlanan enerjiyi kullanarak protonları membranlar arası boşluğa pompalar ve

elektrokimyasal bir gradient oluşturur. Bu gradientte depolanan enerji, protonların tekrar mitokondri matriksine girmesiyle, ATPaz (kompleks V)'ın ATP oluşturmasını sağlar (215, 219). Kompleks V, F1 ve F0 alt birimlerinden oluşur. *Cryptosporidium* hariç tüm apicomplexan genomlarda bulunan F1 alt birimi α, β, γ, δ ve ε olmak üzere beş kısımdan meydana gelir. F0 alt birimi ise a, b ve c olmak üzere üç kısımdan oluşur (215).

2.5.7.1.5. Apicoplast

Apicomplexan protozonların çoğunda bulunan ve fonksiyonel bir organel olan apicoplast; yağ asiti metabolizmasında, hem biyosentezinde, metileritroz fosfat yolu (MEP) aracılığı ile izoprenoid prekürsörlerinin sentezinde görev alır (92, 201, 226). *Babesia bovis*'de apicoplast 109 kümeye (331 EST) sahiptir. Bu gruptaki proteinler, giraz alt birimleri A ile B'yi ve varsayılan DNA polimeraz gibi esansiyel proteinleri kapsar. *Babesia bovis*'de triozfosfat/fosfat translokatörünün (küme 1876 ve 2374; 7 EST) ve S-adenozil metiltransferaz (küme1800 ve 1822; 13 EST) enziminin bulunduğu saptanmıştır. Oldukça fazla miktarda eksprese edilen apicoplast proteinlerinin, HSP83 ve DnaJ-2 şaperonlarının ve piruvat kinazın homologları olduğu gösterilmiştir (219). Diğer fonksiyonlarının yanında ubiquinon (CoQ), mitokonrideki elektron transport zincirinde elektronların kompleks I veya II'den kompleks III'e transferi için esansiyeldir. Konak hücrenin ubiquinon'undan farklı olarak parazitin ubiquinon'unda, 4-hidroksibenzoatprenil transferaz enzimi ile 4-hidroksibenzoat iskeletine eklenen bir izoprenoid yan zincirinin olduğu belirlenmiştir. İzopentenil difosfat (IPP) ve bunun izomeri dimetilallil difosfat (DMAPP) izoprenoidlerin yaygın prekürsörleridir. Ubiquinon sentezi için gerekli tüm enzimler apicomplexanlarda mevcuttur (215). Apicoplastta izoprenoid biyosentezi ile ilgili pek çok EST'ın (8 geni temsil eden 11 kümede 24 EST) belirlenmiş olması, *B. bovis*'de bu metabolik yolun önemli olabileceğini gösterir (219). Ancak fosmidomizin, apicoplastta DOXP redüktoizomeraz basamağında izoprenoid biyosentezini (MEP yolu) inhibe eder. Bu da IPP yokluğuna bağlı olarak ubiquinon sentezinde azalmayla sonuçlanır. Bu durum, apicoplast ile mitokondri arasında metabolik bir bağın oluşmasına yol açtığından *Babesia'*da apicoplastın bulunmasının nedenlerinden biri olabilir (215).

2.5.7.2. Protein ve Nükleik Asit Metabolizması

Purin bazlarının salvaj (kurtarma) yolu enzimlerinden adenin fosforiboziltransferaz ve hipoksantin-guanin fosforibozil–transferaz (HGPRT) *B. bovis*'de yoktur. Öte yandan, purin salvaj yolu tam olmamasına karşın *B. bovis*'in purin nükleosidleri salvaj yoluyla sentezleyebilmesi ilginç bir durumdur. Purin salvaj yolu ile ilgili çeşitli enzimler mevcut (218,

227) olmasına rağmen doğrudan inozin monofosfat üretimini sağlayan bir yol yoktur. Bu metabolik yol için gerekli enzimlerin bulunabileceği, fakat bu enzimlerin bilinen enzimlere benzerlik göstermediği tahmin edilirken (218) son yıllardaki çalışmalar, daha önce apicomplexan parazitlerde tarif edilmeyen EST'ler de dahil *B. bovis*'de purin metabolizması ile ilgili proteinleri kodlayan pek çok EST bulunduğunu göstermiştir. *Theileria parva* ve *T. annulata*'da olduğu gibi, purin bazlarının doğrudan monofosfat nükleotidlere dönüşümünü katalizleyen purin fosforibozil transferazlar *B. bovis*'de de saptanmamıştır (219). *Babesia bovis*'in çeşitli nükleotidlerin interkonversiyonunu gerçekleştirebildiği ve ekzojen hipoksantin ve adenozini, adenin ve guanin nükleotidlerinin yapısına katılmasını sağladığı gösterilmiştir (227).

Babesia bovis'de iki farklı adenozin kinazın yüksek düzeyde ekspresyonu, adenozinin purin salvaj yolunun temel prekürsörü olduğunu gösterebilir. *Babesia bovis* adenozin kinazlarının bakteriyel ribokinazlara büyük benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. *Babesia bovis* adenozin kinazının *B. canis* homoloğu klonlanmış ve etkin bir adenozin kinaz olduğu gösterilmiştir (219). *Cryptosporidium parvum*'da IMP ve tekiben GMP sentezi adenozin monofosfat deaminaz katalizörlüğünde gerkekleşirken, *B. bovis*'de adenozin deaminazı kodlayan bir EST kümesinin varlığı ortaya konmuştur. *Babesia bovis*'de GMP sentezi için gereken IMP, muhtemelen *B. bovis* adenozin kinazlarının biri tarafından inozin'den ürettirilir. Bu kinazların homologları diğer apicomplexan parazitlerin hiç birinde identifiye edilmemiştir. Ayrıca, *B. bovis* iki farklı adenilat kinazı kodlayan tek apicomplexan türdür. *Babesia bovis*'de IMP metabolizması ile ilişkili proteinlerin sentezi fazladır ve bakteriyel-tipteki bir GMP'ı kodlayan 20 EST'lik bir kümenin IMP-GMP siklusunu oluşturduğu satanmış olup bu siklusun *T. annulata*'da da bulunduğu, ancak diğer apicomplexan parazitlerde olmadığı bildirilmiştir. Bakteriyel tipte olması ve bu yolda görevli enzimlerin fazlaca sentezlenmesi *B. bovis*'deki purin salvaj yolunun diğer apikomplexanlardan farklı olduğunu göstermektedir (219).

Diğer pek çok parazitik protozoonda olduğu gibi *Babesia* türleri de gelişimleri ve çoğalmaları için pirimidine ihtiyaç duyarlar. *Babesia bovis* ve *B. bigemina*'da *de novo* pirimidin sentezinin altı enziminin de bulunduğu saptanmıştır (228). Bu *Babesia* türleri ihtiyaç duydukları pirimidinleri, konak eritrositinde sentezlenmiş olan pirimidinlerden salvage yoluyla değil, UMP'ın *de novo* sentezi ile sağlarlar. Öte yandan rodent suşlarında *de novo* pirimidin sentez yolunun altı enziminden beşi [aspartat transkarbamilaz (ATCaz, E.C.2.1.3.2); dihidroorotaz (DHOaz, E.C. 3.5.2.3); dihidroorotat dehidrojenaz (DHO-DHaz, E.C. 1.3.3.1); orotat

fosforiboziltransferaz (OPRTaz, E.C.2.4.2.10); orotidin-5'-posfat dekarboksilaz (ODCaz, E.C.4.1.1.23)] belirlenmiş ve pirimidin sentezinin salvage yoluyla gerçekleştiği bildirilmiştir (229).

2.5.7.3 Lipid Metabolizması

Apicomplexan parazitlerde lipid metabolizması, hastalığın patogenezinde rol oynar. *Babesia* spp. merozoitleri, glikan-fosfatidilinozitol kısmı ile konağın plazma membranına tutunur (230). *Babesia* ile infekte eritrositlerde, enfekte olmayanlara göre çok yüksek düzeyde lipid bulunduğu ve bu lipid artışına merozoitin membran lipidlerinin ve roptriler gibi diğer lipid içeren yapıların katkısı olduğu saptanmıştır. Enfekte eritrositlerde fosfolipid kompozisyonunun da değiştiği; fosfatidilkolin ve fosfatidik asit miktarının yükseldiği belirlenmiştir. Eritrositteki fosfatidilkolin düzeyindeki yükselme, parazitte fosfatidilkolin biyozentezinin artması veya parazitin bu lipidi konaktan alınmasına bağlı olabileceği gibi her iki yol da bu artışa neden olabilir. Fosfatidik asit miktarının artışı ise *B. bovis*'de biyosentez ve konaktan alımın yanı sıra fosfolipaz D aktivitesinin arttığını gösterir. *Babesia bigemina*'da da benzer durum gözlenmiştir. Purifiye *B. bovis* merozoitlerinde, fosfatidilkolinin en fazla bulunan fosfolipid olduğu, az miktarda sfingomiyelin ve lizofosfatidilkolin bulunduğu saptanmıştır. Bunların yanı sıra diasilgliserol ve az miktarda kolesteril esterlerinin varlığı bildirilmiştir. *Babesia bovis*'in [^{3}H] myo-inozitolü fosfatidilinozitolün yapısına katabildiği saptanmıştır. Fosfatidilkolin oluşumu *Babesia*'da lipid metabolizmasının ana biyosentez yoludur (230, 231).

2.5.7.4. *Babesia bovis*'te Bulunmayan Metabolik Yollar

Apicomplexan protozonlar bulundukları hücredeki besin maddelerine kolay ulaştıklarından bu parazitlerde bazı metabolik yollar bulunmaz (215). *Babesia bovis*'in glikoneojenezis, şimik asit sentezi, yağ asidi oksidasyonu, üre siklusu, poliamin, tip-II yağ asidi ile *de novo* purin, hem ve aminoasit sentezleri gibi çok sayıda temel metabolik yollara sahip olmadığı belirlenmiştir (92). *Babesia bovis*'de pirimidinlerin salvaj yoluyla biyosentezinin olmadığı bildirilmiştir (227). *Babesia bovis'*de, *hem* biyosentezinde ikinci basamağı katalizleyen delta aminolevülinik asit dehidrataz (BBOV_II001120)'ın kodlanmadığı tahmin edilmektedir (92). Apicomplexan parazitlerde üre siklusu olmadığından amonyağın muhtemelen mitokondriyal glutamat dehidrojenaz ve/veya glutamin sentetaz ile metabolize edildiği ileri sürülmektedir. Mitokondride bulunmayan bir diğer metabolik yol ise glioksilat siklusudur. β-oksidasyon yönünden aktif olan hücrelerde önemli olan bu metabolik yol, TCA siklusunun bir

varyasyonu olup izositrat liyaz enzimi katalizörlüğünde izositrattan süksinat ve glioksilat üretimini sağlar (215). *Babesia bovis*, dihidropteroat'ın dihidrofolat'a dönüşümünü katalizleyen dihidrofolat sentaz'ı kodlamaz. Ancak bu yetersizlik, muhtemelen bir folat/biopterin taşıyıcısı (BBOV_IV002460) üzerinden ve artan dihidrofolat redüktaz-timidilat sentaz (DHFR-TS) aracılığıyla telafi edilir (92, 232).

2.6. BABESIOSIS'TE TEŞHİS

Bütün hayvan türlerinde akut babesiosis'te yüksek ateş (40- 41,5°C), anemi, ikterus ve hemoglobunüri gibi klinik belirtiler görülür. Bunun yanında kırgınlık, depresyon ve zayıflık gibi genel semptomlar da görülebilir. İnsanlarda ise semptomlar, malarya'ya benzemekle beraber aniden ortaya çıkar ve intravasküler hemoliz, hemoglobunüri, sarılık, kaslarda ağrı, titreme, solunum güçlüğü ve sürekli ateşle seyreder (231, 233). Teşhiste; mevsim, kene enfestasyonu, unstabil bölge gibi epidemiyolojik veriler şüpheleri artırabilir. Ancak hastalığın teşhisi perifer kandan yapılmış ve Giemsa ile boyanmış preparatların mikroskobik incelenmesinde eritrositler içerisinde parazitin görülmesiyle olur. Hastalığa hangi türün yol açtığını belirlemek için ise, parazite karşı oluşan spesifik antikorların serolojik yöntemlerle (IFAT, ELISA vb.) saptanması veya parazit DNA'sının moleküler yöntemlerle (PCR, RLB, Nested-PCR vb.) tespit edilmesi gerekir (78, 234). Bu testler için konusunda uzman kişilere ihtiyaç duyulması, uzun zaman alması, laboratuar malzemelerine ihtiyaç duyulması ve saha şartlarında uygulanamaması gibi dezavantajlar olduğundan son zamanlarda Japonya'da immunochromatographic test (ICT) adı verilen hızlı ve basit bir strip serodiagnostik test geliştirilmiştir. Uzman olmayan kişilerin dahi kolaylıkla kullanabileceği bu test nitroselüloz membran tabanlı olup, membran üzerine *B. bovis* (rap-1), *B. bigemina* (rap-1), *T. equi* (EMA-2t) ve *B. caballi* (Bc48)'ye ait rekombinant proteinler emdirilmiş ve bu membran üzerine şüpheli hayvana ait bir damla kan (antikor) damlatılarak kolaylıkla teşhis yapılabilmektedir (235).

2.6.1. Mikroskobik Muayene

Bu yöntem, tekniğine uygun olarak hasta hayvanlardan alınmış kan örneklerinden ince yayma veya kalın yayma preparatlar hazırlanması suretiyle ince yayma frotiler metil alkolde 5 dakika, kalın yayma frotiler ise 100 ^{o}C'de 15 dakika tutularak tespit edildikten sonra Giemsa ile boyanarak mikroskop altında incelenmesi ve etkenlerin görülmesiyle yapılmaktadır. Yöntem kolaylıkla uygulanabilmekte olup deneyimli personel gerektirmektedir (28, 77, 236, 237). Mikroskobik muayene için alınan kanın vena jugularis yerine, kapillar damarların

geçtiği kuyruk ucu veya kulak ucundan alınması tercih edilmelidir. Çünkü *Babesia* etkenlerini içeren eritrositler kapillar damarlarda birikme eğilimindedirler. Ölüm sonrası yapılan muayenelerde de kandan veya dalak, karaciğer, kemik iliği gibi organlardan hazırlanan sürme preparatlarla da teşhis yapılabilmektedir (28, 77, 236, 237).

Mikroskobik muayene, ince yayma froti veya kalın yayma froti yöntemleriyle yapılmaktadır. Paraziteminin çok yoğun olduğu durumlarda etkenlerin morfolojilerinin daha sağlıklı teşhis edilebilmesi amacıyla ince yayma froti yöntemi kullanılmaktadır. Bunun için çok az miktarda kan temiz bir lam üzerine damlatılarak froti hazırlanır. Kalın yayma froti yöntemi ise paraziteminin düşük olduğu durumlarda tercih edilmektedir. Kalın damla kan preparatlarıyla daha fazla hacimde kan incelenir (28, 77, 236, 237). Her iki yöntemle yapılan frotilerde de lam ve lamellerin temiz olmasına, boyama solusyonun dikkatli hazırlanmasına özen gösterilmelidir. Çünkü deneyimli olmayan personel tarafından yapılan incelemelerde toz partikülleri ile etkenler bazen karıştırılabilmektedir. İnceleme esnasında tüm saha dikkatle incelenmelidir. Asgari 200 mikroskop sahasının incelenmesi esasına dayanan bu durum çok sayıda inceleme yapılmasını gerektiren durumlarda oldukça zaman almaktadır. Her iki yöntemle de yapılan mikroskobik incelemelerde etkenlerin görülmesi enfeksiyonun varlığının göstergesidir. Fakat bazı durumlarda (hastalığın çok erken dönemi veya kronik dönem) frotilerde etkenler görülemeyebilir. Etkenin frotilerde görülememesi enfeksiyonun hayvanda kesinlikle olmadığı manasına gelmez (237, 238). Mikroskobik bakıda pozitif bulunan hayvanlarda paraziteminin hesaplanmasında; en az 50 mikroskop sahasındaki enfekte olan ve enfekte olmayan eritrositler sayılır. Bulunan rakamların ortalaması 4 ile çarpılarak 200 mikroskop sahasındaki sayılar bulunur. Parazitemi;

Parazitemi (%)=Enfekte eritrosit sayısı/Enfekte olan+enfekte olmayan eritrosit sayısı x100 formülü ile hesaplanır.

2.6.2. Serolojik Testler

Babesiosis'in tanısında, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test), sELISA (Slide Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IHAT (Indirect Hemagglutination Test), CFT (Complement Fixation Test), LAT (Latex Agglutination Test) ve RIA (Radioimmunoassay) gibi serolojik testler kullanılmaktadır (27, 28, 236, 239). Akut babesiosisli hayvanların eritrosit, serum veya dokularından hazırlanan antijenlerin kullanıldığı bu testler subklinik seyirli hayvanların serumlarında antikor aranması tekniğine dayanmaktadır. Bu testlerle parazit antijenlerine karşı antikor aranmasının yanında

parazit antikorlarına karşı antijen aranması da mümkündür. Serolojik testler, kronik enfeksiyonların teşhisinde kullanışlı değildir. Çünkü hayvanın kanında etken olmasa bile antikorların varlığı devam etmekte olduğundan serolojik testlerin yanlış pozitiflikler verdiği ve bazı *Babesia* türleri arasında çapraz reaksiyonların şekillenebildiği bildirilmiştir (27, 28, 236, 239).

Babesiosis'in serolojik olarak teşhisinde ilk olarak kullanılan test CFT testidir. Fakat bu testin duyarlılığı düşüktür (240, 241). Bu teste göre duyarlılığı ve güvenilirliği daha fazla olan IFAT tekniği babesiosis'in teşhisinde en sık kullanılan serolojik testlerdendir. Ancak bu testte *Babesia* türleri kendi aralarında çapraz reaksiyonlar verebilmektedir (242-244). Serolojik yöntemlerden ELISA testi de oldukça duyarlı ve etkili bir testtir. Bu test ile bir seferde çok miktarda örnek incelenebilmektedir. Bununla birlikte, testte antijen kalitesi testin duyarlılığını etkilemektedir. Enfekte eritrositlerden hazırlanan antijenler, konak eritrositleri ile kontamine olduklarından, anti-eritrositik antikorlar sebebiyle yanlış sonuçlara sebep olmaktadır. Bu sorunun önüne geçebilmek için saflaştırılmış rekombinant antijenler kullanılmaktadır (245-247).

2.6.3. Moleküler Teknikler

Son yıllarda, mikroskobik incelemeler ve serolojik yöntemlerden farklı olarak parazite ait DNA veya RNA'nın varlığını ortaya koymaya yarayan PCR (Polymerase Chain Reaction), Multiplex PCR, Nested PCR, Reverse Transcriptase PCR, Real-Time PCR, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) PCR, RLB (Reverse Line Blotting) gibi moleküler testler babesiosisin teşhisinde sıklıkla kullanılmaya başlamıştır (236, 237, 248, 249).

Elbetteki her tanı yönteminin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Doğrudan etkeni görmeye yönelik yapılan mikroskobik muayenenin; basit olması, parazitlerin morfolojik olarak ayrımlarının yapılabilmesi, parazitin direkt araştırılması gibi avantajlarının yanında; zaman alması, zahmetli ve yorucu olması, parazit sayısının düşük olduğu durumlarda yanıltıcı olabilmesi, parazitlerin morfolojik olarak ayırımlarında karışıklıkların olabilmesi ve deneyimli personel gereksinimi gibi dezavantajları da mevcuttur (236, 237, 248). Yine serolojik yöntemlerin de avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Basit ve hızlı olması, otomasyona olanak vermesi, çok sayıda örneğin eş zamanlı olarak teşhis edilebilmesi serolojik testlerin avantajlarından olup; düşük özgüllük, aktif ile atlatılmış veya latent enfeksiyonların ayırt edilememesi, parazitler arasında çapraz reaksiyonların şekillenmesi bu testlerin olumsuz yanlarını yansıtmaktadır (236, 237, 248). Bu yöntemlere alternatif olarak

geliştirilen nükleik asit tabanlı moleküler teknikler ile immun sistemden bağımsız veya atlatılmış enfeksiyonlardan etkilenmeksizin konak vücudunda çok az miktarda etken olsa dahi direkt hastalığa neden olan türlerin teşhisleri yapılabilmektedir. Bu moleküler yöntemlerle hastalığa neden olan parazit türlerinin eş zamanlı olarak teşhisleri de yapılabilmektedir. Tabi ki her yöntem gibi bu moleküler yöntemlerin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemler ekonomik olarak pahalı ve çok aşamalı yöntemler olup, inhibitörleri nedeniyle yanlış negatiflikler verebilmekte ve kontaminasyona bağlı yanlış pozitiflikler de gösterebilmektedir (236, 237, 248).

Bu moleküler yöntemlerin hemen hepsinde PCR aşaması mevcuttur. PCR kullanılmaya başlandığından bu yana sürekli geliştirilmekte ve daha duyarlı ve güvenilir sonuçlar için çeşitli varyasyonları ortaya konulmaktadır. Bu yöntem, hedef organizmanın genomundaki, özgül bir DNA dizilimini, tekrarlayan şekillerde, binlerce kez çoğaltarak, kolaylıkla tespit edilebilir hale getirmektedir. PCR'ın modifiye edilmesiyle birlikte; PCR ürününün daha spesifik primerlerle ikinci kez PCR'ını kapsayan Nested PCR (250), birden fazla primer çifti kullanılarak tek reaksiyonda birçok hedef bölgenin aynı anda çoğaltılmasını sağlayan Multiplex PCR (251, 252), kantitatif olarak parazit DNA'sının miktarını tespit eden ve dolayısıyla varlığını ortaya koyan Real-Time PCR (253), bir testte eş zamanlı olarak çok sayıda hastalık etkeninin tespit edilmesine olanak sağlayan RLB (69, 254, 255), parazitin RNA'sının tespitine yönelik yapılan Reverse Transcriptase PCR (256, 257) testi gibi testler geliştirilmiştir. Bu testler babesiosis'in teşhisinde son yıllarda Türkiye'de ve Dünya'da sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Türkiye'de bu yöntemlerle yapılan çalışmalarda genellikle *Babesia* türlerinin 18S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu yapılmış ve bunların sekans dizilimleri ortaya konmuştur (69, 254, 255). Dünya'da da bu gen bölgesi sıklıkla kullanılmakta (66, 248, 258-265), bunun yanında özellikle sığır babesiosis'i üzerine yapılan aşı çalışmalarında VMSA genleri (*msa-1, msa-2a$_1$, msa-2a$_2$, msa-2b, msa-2c*) ve *rap-1* geninin amplifikasyonu yapılmakta ve bu gen bölgelerini içeren suşların sekans dizilimleri ortaya konmaktadır (100, 107, 135, 139, 145, 147, 219, 266-278).

2.7. BABESIOSIS'TE TEDAVİ

Babesiosis’in tedavisinde sığırlarda yıllarca quinuronium sulphate, amicarbalide isothionate ve diminazene aceturate kullanılmış; 1970’ten sonra dördüncü bir ürün olarak da imidocarb dipropionate kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde de tedavi bu ürün ile yapılmaktadır (78, 234). Tek tırnaklıların (279, 280) ve karnivorların (281) tedavisinde de imidocarb grubu

ilaçlar ve diminazene aceturate kullanılmakta olup köpeklerde ayrıca trypan blue enjeksiyonu da başarılı olmaktadır. Yine köpeklerde atovaquone ve azithromycin kombinasyonunun da istenilen tedaviyi gerçekleştirdiği belirtilmiştir (282). Bunların yanında son zamanlarda yapılan çalışmalarda babesiosis'in tedavisinde epoxomicin'in başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (283). İnsanlarda ise tedavi amacıyla atovaquone, chloroquine, quinine, clindamycin ve azithromycin kombinasyonları kullanılmaktadır. Bunun yanında destek tedavisi de uygulanmaktadır (78, 233, 284, 285). Bugün Türkiye'de sığırlarda babesiosis'in tedavisinde kullanılan ruhsatlı preparatlar T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nden alınan bilgilere göre Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Türkiye'de sığırlarda babesiosis tedavisinde kullanılan ruhsatlı preparatlar

Farmakolojik Grup/Antibabesial		Uygulama Şekli	Farmakolojik Şekli	Firma Adı	Ambalaj	Etken Madde Adı	Etken Madde Miktarı
Sıra No	**İlaç Adı***						
1	Acaprin %12	Enjektable/IM	Çözelti	Bayer	1 ml	İmidocarb dipropiyonat	120 mg
2	Akmizol	Enjektable/IM	Çözelti	Aksu Ecz.	1 ml	İmidocarb dipropiyonat	120 mg
3	Babedif	Enjektable/IM	Çözelti	Ceva-Dif	1 ml	İmidocarb dipropiyonat	120 mg
4	Babesit	Enjektable/IM	Çözelti	Bavet	1 ml	İmidocarb dipropiyonat	120 mg
5	Carbak	Enjektable/IM	Çözelti	Ak-Tıp	1 ml	İmidocarb dipropiyonat	120 mg
6	E-Carbzol	Enjektable/IM	Çözelti	Hektaş	1 ml	İmidocarb dipropiyonat	120 mg
7	Imidoparadecto	Enjektable/IM	Çözelti	Vetaş	1 ml	İmidocarb dipropiyonat	120 mg
8	Imozan	Enjektable/IM, SC	Çözelti	Provet	1 ml	İmidocarb dipropiyonat	120 mg
9	İmicarp	Enjektable/IM	Çözelti	Teknovet	1 ml	İmidocarb dipropiyonat	120 mg
10	İmidovil	Enjektable/IM	Çözelti	Vilsan	1 ml	İmidocarb dipropiyonat	120 mg
11	İmizol	Enjektable/IM, SC	Çözelti	Ceva-Dif	1 ml	İmidocarb dipropiyonat	120 mg
12	İmocel	Enjektable/IM	Çözelti	Çelikler	1 ml	İmidocarb dipropi yonat	120 mg
13	Kanaprim	Enjektable/IM	Çözelti	Alke	1 ml	İmidocarb dipropiyonat	120 mg
14	Pirovet-F	Enjektable/IM, SC	Çözelti	Topkim	1 ml	İmidocarb dipropi yonat	120 mg

*Alfabetik sıra, IM: Intramuscular, SC: Subcutan

2.8. BABESIOSIS'TE KORUNMA VE KONTROL

Babesiosis'te esas olan, hastalığın sağaltımından ziyade karşı koruyucu önlemlerin alınmasıdır**.** Koruyucu önlemler vektör kenelerle mücadele, premunizasyon ve aşılamadır (27, 28).

2.8.1. Kene Kontrolü

Kene mücadelesi çeşitli akarisitlerle yapılabileceği gibi virus, bakteri, protozoon, nematod, mantar gibi çeşitli biyolojik ajanlar ve kene aşılarıyla da yapılmaktadır (155, 286, 287). Özellikle kene aşılarıyla yapılan çalışmalar sonucu, *B. microplus*'un *Bm86* geninden elde edilen ticari aşıların (Gavac^{TM}, TickGARD^{PLUS}), kenelerin sayısında, doyma ağırlıklarında ve fertilite oranlarında önemli derecede azalma sağladığı tespit edilmiştir (288, 289). Bu ticari aşıların *Boophilus (Rhipicephalus) annulatus, B. decolaratus, Hyalomma a. anatolicum* ve *H. dromedarii*'ye karşı koruyuculuk sağlarken, *Amblyomma variegatum, A. cajennense* ve *R. appendiculatus*'a karşı koruyuculuk sağlamadığı bildirilmiştir (287). Bunun yanında *Ixodes scapularis*'in subolesin olarak adlandırılan *4D8* geniyle yapılan immunizasyon çalışmalarında bu genin RNA interferens (RNAi) etkisiyle kenelerin beslenme ve yumurtlamalarında önemli azalmalara yol açtığı saptanmıştır. RNAi, kenelerde ve çoğu ökaryotlarda bulunan ve koruyucu özeliği olan post-transkripsiyonel bir gen-silencing mekanizmasıdır (151).

2.8.2. Premunisyon

Homolog suşlara karşı premunisyon amacıyla duyarlı hayvanlara, babesiosis'li sığırın enfekte kanı verilip klinik belirtilerin oluşması ile birlikte küratif dozun altında diminazen aceturat veya imidocarb preparatları uygulanarak hastalığın ortaya çıkışı önlenir. Böylece belirli bir miktar parazitin canlı kalmasına müsaade edilerek homolog suşlara karşı duyarlı sığırların preimmun duruma getirilmesi sağlanır (155).

2.8.3. Aşılama

Dünyanın muhtelif yerlerinde sığır ve köpek babesiosis'ine karşı aşı uygulamaları yapılmaktadır. Sığır babesiosisi'ne karşı aşılamada başlangıçta homolog suşlara karşı cansız aşılarla kısmen koruma sağlanmış (290, 291) ise de son yıllarda aşılamada daha çok canlı aşılar kullanılmaktadır. Fakat canlı aşıların bazı dezavantajları içermesi sebebiyle rekombinant aşı çalışmalarına hız verilmiştir (155, 272). Bu amaçla özellikle Avustralya, Arjantin, Güney

Afrika, İsrail ve Uruguay'da rekombinant aşı çalışmaları devam etmektedir (19). 1990'dan beri Avustralya'da *B. bovis*'in 3 suşu ve *B. bigemina*'nın bir suşu (G suşu) aşı üretiminde kullanılmaktadır (292). Özellikle canlı aşı olarak Güney Afrika, İsrail ve Avustralya'da *frozen* (dondurulmuş) aşılar kullanılmakta ve bu aşılar *chilled* (soğutulmuş) aşılara göre daha fazla dayanıklılık göstermektedir. Bu aşıların soğukta muhafaza edilmesi amacıyla gliserol kullanılmaktadır. Nakil esnasında N_2 (nitrojen) veya sıvı CO_2 kullanılması gerekmektedir. Avustralya'da üretilen monovalent *B. bovis* ve *B. bigemina* aşıları (Combovac) ticari olarak 2001'den beri satılmaktadır (19). Bunun yanında soğutulmuş formda aşılar sadece Avustralya'da 1966-2003 yılları arasında 35 milyon doz uygulanmıştır. Bu aşının dondurulmuş formlara göre avantajları; kısıtlı kaynaklarla daha kolay üretilmesi, naklinin ve kullanımının daha kolay olmasıdır. Halen Avustralya'da kullanılan bu aşılar 2 ml doz içerisinde $1x10^7$ *B. bovis*, $25x10^6$ *B. bigemina* ve $1x10^7$ *Anaplasma centrale* içermektedir. Bu aşıların raf ömrü oldukça kısa olup yaklaşık 4 gündür (293). Bunun yanında rekombinant aşı çalışmaları genellikle, doğal immun sığırlarda fonksiyonel olarak immunodominant olan merozoit yüzey antijenleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu amaçla genellikle *B. bovis msa-2c* antijenleri ile *B. bovis* ve *B. bigemina*'da ortak olarak bulunan *rap1* geni kullanılmaktadır. *msa-1* ve *msa-2c* antijenlerinin merozoitlerin eritrositlere invazyonunu nötralize ettiği fakat bu antijenlerin sığırlarda koruma sağlamadığı bildirilmiştir (107, 266). *rap-1* antijeninin ise sadece homolog suşlara karşı kısmi bir koruma sağladığı saptanmıştır (294). Bu çalışmaların yanında alternatif olarak DNA aşı adjuvantları geliştirilmeye başlanılmıştır. *Babesia bovis*'in B hücrelerinden elde edilen DNA içerisindeki CpG motifleri IgG üretimini teşvik etmektedir. Aktive olmuş makrofajlar da IL-12, TNF-α ve NO salgılayarak parazitlerin replikasyonun kontrolü için önemli bir doğal immunite sağlamaktadır (190).

Köpek babesiosis'ine karşı aşılamada etkili bir koruma amacıyla *B. canis* soluble parazit antijenleri (SPA) kullanılmaktadır. Ancak bu antijenlerle yalnızca homolog suşlara karı koruma sağlanmaktadır. Bu dar spektrumlu korumayı genişletmek amacıyla *B. canis* ve *B. rossi* SPA'larının kombinasyonları ile yapılan bir aşı (Nobivac piro) ile heterolog suşlara karşı da koruma sağlanmıştır (295).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. SAHA ÇALIŞMALARI

3.1.1. Hayvan Materyali (Sığırlar)

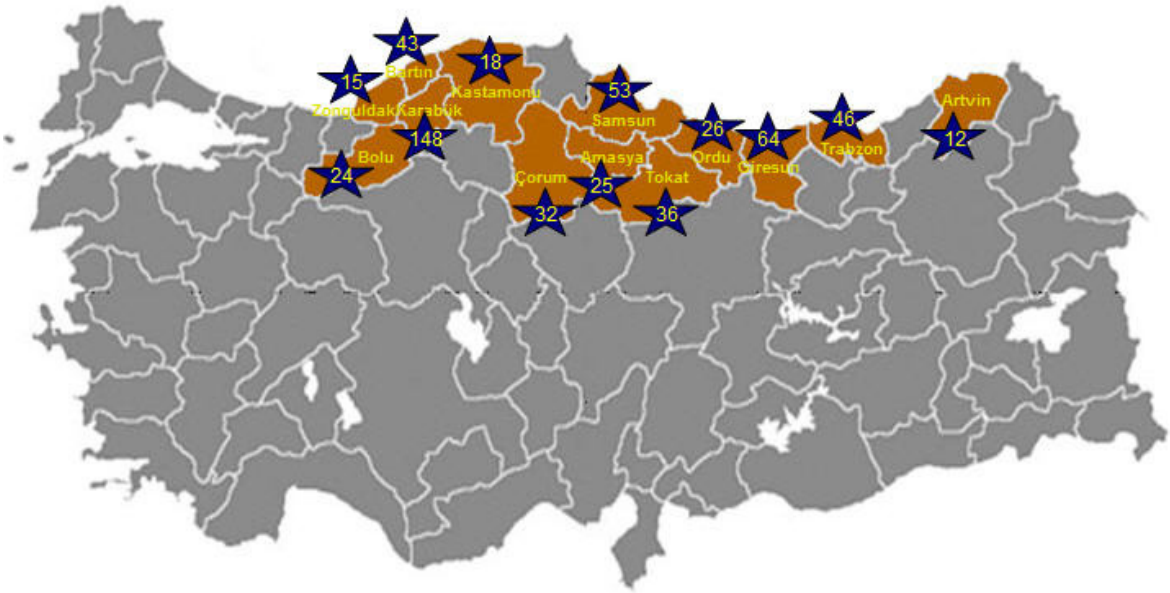
Bu çalışmanın materyalini, 2008-2010 yıllarının çeşitli dönemlerinde Karadeniz Bölgesi'ndeki 13 vilayete (Amasya, Artvin, Bartın, Bolu, Çorum, Giresun, Karabük, Kastamonu, Ordu, Samsun, Tokat, Trabzon, Zonguldak) bizzat gidilerek veya Tarım İl Müdürlük'lerindeki Veteriner Hekimler ve serbest çalışan Veteriner Hekimlerle temasa geçilerek, meraya çıkmış ve rastgele seçilmiş toplam 542 sığırdan alınan kan örnekleri oluşturmuştur (Tablo 3.1, Şekil 3.1). Hayvanlara ait bilgiler (yaş, cinsiyet, ırk) hayvan sahiplerinden alınmış (Tablo 3.2) ve genel sağlık durumları kaydedilmiştir.

3.1.2. Kan Örnekleri

Rastgele seçilen toplam 542 sığırın *vena jugularis*'inden tekniğine uygun olarak 5 ml'lik steril EDTA'lı (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate) tüplere kan alınmış ve örnekler soğuk zincirde taşınarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Protozooloji-Entomoloji Bilim Dalı Laboratuarı'na getirilmiştir. Laboratuara getirilen kan örneklerinin herbirine protokol numarası verilmiştir. Kan örneklerinden mikroskobik inceleme için preparatlar hazırlanmış ve analizleri yapılıncaya kadar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.1. Kan örneklerinin alındığı iller ve örneklerin dağılımı

İller	**Örneklerin**	
	Sayısı	%
Amasya	25	4,6
Artvin	12	2,2
Bartın	43	7,9
Bolu	24	4,4
Çorum	32	5,9
Giresun	64	11,8
Karabük	148	27,3
Kastamonu	18	3,3
Ordu	26	4,8
Samsun	53	9,8
Tokat	36	6,7
Trabzon	46	8,5
Zonguldak	15	2,8
TOPLAM	542	100



Şekil 3.1. Kan örneklerinin alındığı iller ve örnek sayıları

Tablo 3.2. Karadeniz Bölgesi'nde incelenen sığırların yerleşim yerine, yaş, cinsiyet ve ırkına göre dağılımı

Yerleşim Yeri	İncelenen Sığır Sayısı										
	*Irk					Yaş (yıl)			Cinsiyet		
	Smntl	Hlstn	Mntfn	Jrsy	Yrl	≤2	3-5	≥6	Dişi	Erkek	Toplam
Amasya	6	7	5	3	4	5	9	11	20	5	25
Artvin	3	5	2	1	1	1	6	5	10	2	12
Bartın	7	18	5	5	8	7	21	15	35	8	43
Bolu	3	8	5	4	4	6	11	7	19	5	24
Çorum	8	10	6	3	5	8	14	10	26	6	32
Giresun	13	22	9	8	12	14	22	28	51	13	64
Karabük	20	53	21	17	37	32	65	51	121	27	148
Kastamonu	4	7	3	2	2	4	8	6	15	3	18
Ordu	7	7	4	3	5	7	10	9	21	5	26
Samsun	10	13	7	11	12	18	16	19	40	13	53
Tokat	8	12	4	5	7	9	10	17	25	11	36
Trabzon	9	18	5	8	6	18	17	11	34	12	46
Zonguldak	2	5	3	2	3	3	5	7	14	1	15
Toplam	100	185	79	72	106	132	214	196	431	111	542

*Smntl: Simental, Hlstn: Holstein, Mntfn: Montafon, Jrsy: Jersey, Yrl: Yerli

3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI

3.2.1. Mikroskobik İnceleme

Sığırların vena jugularis'den alınarak EDTA'lı tüpler içerisinde laboratuara getirilen kan örneklerinden her bir hayvan için sürme preparatlar hazırlanmıştır. Frotiler havada kurutulduktan sonra metil alkolde 5 dakika tespit edilmiş ve %5'lik Giemsa boya solusyonu (pH 7.2) içerisinde oda sıcaklığında 40 dakika süreyle boyanmıştır. Süre sonunda boyanan preparatlar hafifçe akan musluk suyu altında yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Preparatlar, kuruduktan sonra ışık

mikroskobu altında immersiyon yağı damlatılarak x100'lük objektif ile *Babesia* ve *Theileria* türleri yönünden incelenmiştir.

3.2.2. DNA Ekstraksiyonu

Sığır kanlarından DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Protozooloji-Entomoloji Bilim Dalı Laboratuarı'nda bulunan ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır. Analize tabi tutulana kadar -20°C'de muhafaza edilen örnekler ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözünmeye bırakılmıştır. Çözünen örneklerden DNA ekstraksiyonu, Axygen Firmasına ait AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit'inin prosedürüne göre yapılmıştır.

Kullanılan ticari kitin içeriği Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ticari Kitin İçeriği

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

Ekstraksiyon işlemine başlamadan önce ticari kitin prosedürüne göre Buffer W1A ve Buffer W2A solusyonları üzerine %100'lük ethanol eklenmiştir. Kit, kullanılana kadar oda ısısında muhafaza edilmiştir. Ticari kitin önerileri doğrultusunda DNA ekstraksiyon işlemi şu şekilde yapılmıştır:

1. İşleme başlamadan önce, kan örnekleri vorteksle homojenize edildi. İşlenecek numune sayısına göre, örneklerin karışmaması amacıyla ependorf tüplerinin üzerine hayvanlara ait

protokol numaraları yazıldı. Kit içerisinde bulunan Buffer TE, önceden ısısı 65 ^{o}C'ye ayarlanmış su banyosu içerisine konuldu.

2. 1.5 ml'lik ependorflara 500 µl Buffer AP1 eklendi.
3. Herbiri farklı sığıra ait kan örneklerinden 200 µl kan, pipetle alınarak protokol numaralarına göre ependorflara ilave edildi. Tüplerin ağızları kapatılarak 10 saniye vortekslendi.
4. İyice vortekslenen örneklerin üzerine 100 µl Buffer AP2 ilave edilerek ependorf tüpleri tekrar vortekslendi.
5. Örnekler oda ısısında 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücresel kısımların dibe çökmesi sağlandı.
6. Her bir örnek için 2 ml'lik ependorf tüplerine miniprep kolon yerleştirildi. Santrifüj işlemi sonucu üstte kalan süpernatant pipet yardımıyla alınarak miniprep kolonlar içerisine konularak 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifügasyon sonucu, süpernatant içerisinde parazite ait genomik DNA varsa, bunlar DNA'yı tutma özelliğinde olan miniprep column'da kaldı ve geri kalan süpernatant da 2 ml'lik ependorfların dip kısımlarına süzüldü. Dibe çöken süpernatantlar döküldü ve miniprep columnlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirildi. Miniprep kolonlar içerisine ilk yıkama solusyonu olan 700 µl Buffer W1A ilave edilerek oda ısısında 2 dakika bekletildi. Sonra 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Miniprep kolondan süzülerek ependorfun dibine çöken sıvı uzaklaştırıldı. Miniprep kolonlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirildi. İçerisine ikinci yıkama solusyonu olan Buffer W2A'dan 800 µl ilave edildi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Süzülen sıvı tekrar uzaklaştırılarak miniprep kolonlar bu tüplere geri yerleştirildi. Bu basamakta ikinci yıkama solusyonu Buffer W2A'dan 500 µl eklenip 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek tekrar yıkama işlemi yapıldı. Bu son yıkama opsiyonel olarak yapılan bir işlem olup sekanslama işlemlerinde problem teşkil edebilecek tuz ve enzimlerin tamamen elimine edilmesi amacıyla yapılmıştır.
10. Yıkama işlemi sonucu dibe süzülen sıvı kısım uzaklaştırılarak miniprep columnlar boş ependorflar içerisine yerleştirildi. Herhangi bir solusyon eklenmeden boş tüpler 14.000

rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama solusyonları içerisindeki ethanolün tamamen uçması sağlandı.

11. Herbir örneğe ait miniprep kolonlar 1,5 ml'lik yeni ependorf tüplerine yerleştirildi. Üzerlerine, önceden 65 ^{o}C'lik su banyosuna konulmuş olan Buffer TE'den 80 µl ilave edilerek oda ısısında 1 dakika bekletildi. Daha sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak genomik DNA elde edildi. Elde edilen DNA'lar analize tabi tutulana kadar derin dondurucuda (-20 ^{o}C) muhafaza edildi.

3.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reverse Line Blotting testinin yapılabilmesi için gerekli amplikonların elde edilmesi amacıyla PCR işlemi yapılmıştır. PCR solusyonları, herhangi bir kontaminasyonun önüne geçmek amacıyla ultraviyole (UV) sterilizasyon özelliği olan steril laminer kabinde (Biolaf) hazırlanmıştır. PCR solusyonlarının hazırlanması esnasında sadece PCR amaçlı kullanılan steril pipetler, pipet uçları ve deiyonize su kullanılmıştır. Çalışma esnasında sürekli steril pudrasız eldivenler kullanılmış ve en ufak bir şüphede dahi eldivenler değiştirilmiştir.

PCR reaksiyonunda primer olarak *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S rRNA (ribosomal RNA) geninin değişken V4 bölgesinden, büyüklüğü yaklaşık 390 ile 430 bp (base pairs= baz çifti) arasında değişen bir parçayı amplifiye eden genel primerler (Tablo 3.4) kullanılmıştır. Bu reaksiyonda kullanılan primerler Georges ve ark. (259)'nın bildirdiği şekilde kullanılmıştır. RLB işlemi için reverse primeri biotinle işaretlettirilmiştir. Primeler, İontek firmasına sentezlettirilmiştir.

Tablo 3.4. RLB testi amacıyla yapılan PCR'da kullanılan primerler

Primer Adı	**Primer Dizilimi (5'---3')**	**TM* (^{o}C)**
RLB-F2	GACACAGGGAGGTAGTGACAAG	56,9
RLB-R2	biotin-CTAAGAATTTCACCTCTGACAGT	52,2

*TM: Melting Temperature

Liyofilize halde firmadan teslim alınan primerler firmanın önerileri doğrultusunda her birinin konsantrasyonu 100 pmol/ µl olacak şekilde steril deiyonize su ile sulandırılmıştır. Yine firmanın

önerileri doğrultusunda sulandırılan primerlerin, sürekli dondurulup çözündülerek zarar görmelerinin engellenmesi ve stok primer solusyonunun kontaminasyon riskinin önlenmesi amacıyla 0,5 ml'lik bir ependorf tüpüne stok primer solusyonundan 30 µl miktarında primer solusyonu hazırlanarak ana stok solusyon parsellenmiştir. Bu 30 µl'lik primer solusyonu bittiğinde ise esas primer stoğundan tekrar aynı miktarda hazırlanmıştır.

PCR testinin çalışıp çalışmadığının ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; pozitif kontrol olarak laboratuarımızda mevcut olan *Babesia* ve *Theileria* yönünden pozitif saptanan örnekler, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

PCR reaksiyonu için karışım hazırlanırken Georges ve ark. (259) ve Gubbels ve ark. (66) tarafından bildirilen miktarlar modifiye edilmiş ve uygun bir optimizasyon sağlanmıştır. Reaksiyon için 50 µl'lik bir karışım hazırlanmıştır. Bu reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 3.5'te gösterilmiştir.

Tablo 3.5. PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları

Malzemeler	**Miktarları** (µl)
10XTaq buffer (with $(NH_4)_2SO_4$, 1,25 ml)	5
$MgCl_2$ (25 mM)	4
dNTP Mix (10 mM each)	1
RLB-F2 primeri (100 pmol/ µl)	0,7
RLB-R2 primeri (100 pmol/ µl)	0,7
Taq DNA Polymerase (recombinant, 5 u/ µl, 500 u)	1
Deiyonize su	32,6
Genomik DNA	5
TOPLAM HACİM	50

Laminar kabin içerisinde steril şartlarda hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 0,5 ml'lik DNA'se ve RNA'se free ependorf tüpleri içerisine konulmuştur. Tüpler thermal cycler cihazına (Thermo

Hybaid) yerleştirilerek amplifikasyona tabi tutulmuştur. Amplifikasyon için gerekli PCR şartları Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6. PCR'da amplifikasyon için gerekli şartlar

Siklus Sayısı	Isı	Süre
1 siklus	94 °C	3 dakika
2 siklus	94 °C 67 °C 72 °C	20 saniye 30 saniye 30 saniye
2 siklus	94 °C 65 °C 72 °C	20 saniye 30 saniye 30 saniye
2 siklus	94 °C 63 °C 72 °C	20 saniye 30 saniye 30 saniye
2 siklus	94 °C 61 °C 72 °C	20 saniye 30 saniye 30 saniye
2 siklus	94 °C 59 °C 72 °C	20 saniye 30 saniye 30 saniye
40 siklus	94 °C 57 °C 72 °C	20 saniye 30 saniye 30 saniye
1 siklus	72 °C	10 dakika

3.2.4. PCR Ürünlerinin Elektroforez ile Görüntülenmesi

PCR ile amplifikasyon sonucu elde edilen amplikonların görüntülenmesi amacıyla yatay elektroforez tankı (CLP) kullanılmıştır. Toplam hacim 1 lt olacak şekilde; 980 ml deiyonize su üzerine 20 ml 1XTAE (Tris-acetate-EDTA) buffer eklenerek elde edilen solusyon, hem jel hazırlanmasında hem de elektroforez tankının içerisinin doldurulmasında kullanılmıştır. Ürünlerin görüntülenmesinde %1,5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Jelin fazla kalın olmaması için

500 ml'lik bir beher içerisinde toplam hacim 50 ml olacak şekilde; 0,75 mg agaroz tartılarak üzerine 50 ml 1XTAE ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım; agaroz, sıvı içerisinde tamamen eriyene kadar ısıtılmıştır. Karışımın buharlaşmasını engellemek amacıyla beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Karışım hazır hale geldiğinde biraz soğumaya bırakıldıktan sonra üzerine 3 µl ethidium bromide ilave edilmiş ve ethidium bromidin sıvı içerisine tamamen dağılması için yavaş bir şekilde bilek hareketleriyle solusyon karıştırılmıştır. Tamamen hazır hale gelen solusyon jel tablasına dökülmüş ve incelenecek örnek sayısına göre taraklar yerleştirilmiştir. Jel tamamen soğuduğunda jel tablası ile birlikte elektroforez tankına yerleştirilmiş ve 1XTAE solusyonu ile dolu tankın içerisinde taraklar yavaşça çıkarılmıştır. Elden edilen PCR ürünlerinin her birinden 10 µl alınıp, 1 µl 6X loading dye (Fermentas) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. İlk gözlere bantların boylarının ölçülmesinde kullanılan DNA ladder (Fermentas), son kuyucuklara ise pozitif ve negatif örnekler yüklenmiştir. Yüklenen örnekler; sabit akımda, 90 V'da 50 dakika süreyle yürütülmüştür. Süre sonunda örnekler jel dökümentasyon sistemi (Gen Genuis) ile UV ışın altında görüntülenmiştir. PCR ürünlerinden arta kalan 40 µl'lik amplikonlar ise RLB hibridizasyonunda kullanılmak amacıyla +4 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5. Reverse Line Blotting (RLB)

3.2.5.1. RLB Problarının Seçimi

RLB'de kullanılacak problar, negatif yüklü olan Biodyne C membrana (Pall Biosupport group, Ann Arbor, MI) kovalent olarak bağlanabilmeleri için, 5'- uçlarında amino grubu (N-terminal N-trifluoracetamidohexyl-cyanoethyl, N, N-diisopropyl phosphoramitide (TFA)-C_6 aminolinker) içerecek şekilde Genset (Fransa), Isogen (Hollanda) ve MWG (Almanya) firmalarına sentezlettirilmiştir. Probların sekans dizilimleri, Gubbels ve ark. (66) ve Georges ve ark. (259)'na göre alınmış olup Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7. RLB Problarının Sekans Dizilimleri

Özgün Türler	**Konsantrasyon (pmol)**	**Prob dizilimi (5'---3')**
Theileria ve *Babesia* Türleri (Catch All)	100	TAATGGTTAATAGGARCRGTTG
Babesia bovis	100	CAGGTTTCGCCTGTATAATTGAG
Babesia bigemina	100	CGTTTTTTCCCTTTTGTTGG
Babesia divergens	400	GTTAATATTGACTAATGTCGAG
Babesia major	200	TCCGACTTTGGTTGGTGT
Theileria annulata	400	CCTCTGGGGTCTGTGCA
Theileria buffeli/orientalis	400	GGCTTATTTCGGWTTGATTTT

T: Thymine; A: Adenine; C: Cytosine; G: Guanine; R: A veya G; W: A veya T

3.2.5.2. RLB Membranın Hazırlanması

RLB için membranın hazırlanması şu şekilde yapılmıştır:

1. Problar optimum konsantrasyon için 100-500 pmol/150 µl oranlarında sulandırıldı. Sulandırmada pH'sı 8.4 olan 500 mM'lık $NaHCO_3$ kullanıldı.
2. Membran oda ısısında, taze hazırlanmış 10 ml %16 EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) içerisinde 10 dakika aktive edildi ve sonra su ile yıkandı.
3. Membran yıkama işleminden sonra MN45 miniblottera (Immunetics, Cambridge, Mass) yerleştirildi. Miniblotterın vidaları sıkılandı ve fazla su slotlardan vakumla uzaklaştırıldı.
4. Miniblotterın ilk ve son kanalı 2X SSPE ile 1:100 oranında sulandırılmış mürekkep, diğer kanalları ise 150 µl sulandırılmış oligonükleotid solusyonu ile dolduruldu.
5. Tüm örnekler konduktan sonra oda ısısında 2-3 dakika inkübe edildi.
6. İnkubasyondan sonra oligo solusyonları dolduruğu şekilde uzaklaştırıldı.
7. Membran pens yardımıyla miniblotterdan uzaklaştırılarak 100 mM'lık NaOH içinde 10 dakika inkübe edildi. Bu sürenin aşılmamasına dikkat edildi. Çünkü 10 dakikadan fazla süren inkübasyonlarda zayıf sinyal hibridizasyonu meydana gelmektedir.

8. Membran 2X SSPE/0.1 SDS içerisinde 60 °C'de 5 dakika boyunca yıkanarak kullanıma hazır şekle getirildi.

3.2.5.3. RLB Hibridizasyonu

RLB hibridizasyonu şu şekilde yapılmıştır:

1. PCR sonucu elde edilen PCR ürünlerinden 40 µl alınarak üzeri 2X SSPE/0.1 SDS karışımı ile 150 µl'ye tamamlandı.
2. Sulandırılan örnekler 100 °C'de 10 dakika süre ile denatüre edildi ve denatüre edilen ürünler tekrar yapışmaya maruz kalmamaları için aniden buz üzerinde soğutuldu.
3. Membran oda ısısında 2X SSPE/0.1 SDS ile sallanan bir platformda 5 dakika inkübe edildi.
4. Membran önceden yüklenen oligonükleotid sıraları ile miniblotterın kanalları 90° açı yapacak şekilde miniblottera yerleştirildi.
5. Membranda kalan fazla sıvı uzaklaştırıldı.
6. Hava kabarcığı olmayacak şekilde, sulandırılmış PCR ürünleri slotlara dolduruldu. Düz bir zeminde 42 ^{o}C'de 1 saat hibridize edildi. Bu esnada slotlar arasında geçiş olmamasına dikkat edildi ve paltformun sallanmamasına özen gösterildi.
7. İnkübasyon sonunda aspirasyon ile örnekler membrandan uzaklaştırıldı. Membran pens yardımıyla alındı.
8. Miniblotterdan alınan membran, 52°C'de 2X SSPE/0.5 SDS solusyonu ile 2 defa 10 dakika yıkandı.
9. Daha sonra membran 42 °C'de 30 dakika 5 ml peroksidaz ile işaretlenmiş streptavidin konjugatı ile hafif çalkalanarak (2X SSPE/%0.5 SDS ile 1:4000 oranında sulandırıldı) inkübe edildi.
10. Membran, 42°C'de 2X SSPE/0.5 SDS solusyonu ile 2 defa 10 dakika yıkandı.
11. Bu yıkama işlemini takiben membran oda ısısında 2X SSPE ile 2 defa 4 dakika yıkandı.
12. Membran daha sonra 4 ml ECL sıvısı ile 1 dakika inkübe edildi.
13. İnkübasyondan sonra membranın üzeri asetat ile örtülerek hava kabarcıkları uzaklaştırıldı.

14. Görüntüleme amacıyla karanlık odada asetatın üzerine ECL filmi koyuldu ve sinyal yoğunluğuna göre 1 dakika ile 10 dakika arasında film asetatın üzerinde tutuldu.

15. ECL film daha sonra banyo edildi.

Değerlendirmede filmler üzerinde prob ve PCR ürünlerinin döküldüğü sıralarının kesiştiği yerlerde meydana gelen siyah lekeler pozitif olarak kabul edildi.

3.2.5.4. Membranın Temizlenmesi ve Muhafazası

Görüntüleme işleminden sonra membranı temizlemek ve sadece oligonükleotidleri membranda bırakmak amacıyla membran öncelikle 90 ^{o}C'de %1 SDS ile 2 defa 30'ar dakika inkübe edildi. Daha sonra membran 20 mM'lık EDTA ile dolu bir plastik kapta 15 dakika inkübasyona tabi tutuldu. En son aşamada muhafaza amaçlı bir sonraki kullanıma kadar membran 20 mM'lık EDTA bulunan plastik bir kaba koyularak +4 ^{o}C'de muhafaza edildi.

3.2.5.5. RLB'de Kullanılan Solusyonların Hazırlanması

1. 2 X SSPE/0.5SDS: 100 ml 20X SSPE+50 ml 10 % SDS +2 ml 0,5 M EDTA. Deiyonize su ile 1 litre'ye tamamlanır.
2. 2 X SSPE/0.1 SDS: 100 ml 20X SSPE+10 ml 10 % SDS +2 ml 0.5 M EDTA. Deiyonize su ile 1 litre'ye tamamlanır.
3. %10 SDS : 10g SDS'in üzeri deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır.
4. 20 X SSPE: 175,35 g NaCl+27,6 g $NaH_2PO_4(H_20)$+7.45g EDTA. Deiyonize su ile 1 litre'ye tamamlanır. 10 N'lik NaOH ile pH 7.4 olacak şekilde ayarlanır. Kaynatılarak tamamen çözünme sağlanır.
5. %16 EDAC: 1, 6 g EDAC'ın üzeri 10 ml'ye tamamlanır. Kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlanır.
6. 500 mM $NaHCO_3$: 42 g $NaHCO_3$'ün üzeri deiyonize su ile 1 litreye tamamlanır. pH'sı 8,4 olarak ayarlanır.
7. 10 N NaOH: 40 g NaOH'ın üzeri deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.2.6. Nested-PCR

RLB testinin sonuçları değerlendirildiğinde *Babesia* türleri açısından bazı örnekler, catch-all'da *Babesia* spp. pozitif verdiği halde, *B. bovis* ve/veya *B. bigemina* ile pozitiflik vermemiştir. Bunun üzerine *Babesia* spp. pozitif çıkan numunelerin *B. bovis* mi? *B. bigemina* mı? olduğunu tespit etmek amacıyla RLB'ye oranla daha spesifik olan Nested-PCR testi uygulanmıştır. Nested-PCR işlemi için ilk PCR'dan sonra elde edilen amplikonlar kullanılarak farklı primerler ile ikinci bir PCR daha yapılmıştır. Her iki PCR için de Figueroa ve ark. (296)'nın bildirdiği primerler kullanılmıştır. Nested-PCR için kullanılan primerler Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8. Nested-PCR'da Kullanılan Primerler

	Primer		**Dizilimi (5'---3')**	**TM (^{o}C)**
B.bovis	1. PCR	BOF	CACGAGGAAGGAACTACCGATGTTGA	64,8
		BOR	CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGTCA	66,4
	Nested-PCR	BOFN	TCAACAAGGTACTCTATATGGCTACC	61,6
		BORN	CTACCGAGCAGAACCTTCTTCACCAT	64,8
B. bigemina	1. PCR	BILA	CATCTAATTTCTCTCCATACCCCTCC	63,2
		BILB	CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG	66,4
	Nested-PCR	BILAN	CGCAAGCCCAGCACGCCCCGGTGC	74,7
		BILBN	CCGACCTGGATAGGCTGTGTGATG	66,1

Nested-PCR'ın ilk aşamasında; *B. bovis* için hazırlanan reaksiyon karışımında BOF ve BOR primerleri, *B. bigemina* için BILA ve BILB primerleri kullanılmış olup amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplikonlar ikinci PCR'da PCR ürünü olarak kullanılmıştır. İkinci PCR'da yani nested aşamasında; *B. bovis* için hazırlanan reaksiyon karışımında BOFN ve BORN primerleri, *B. bigemina* için ise BILAN ve BILBN primerleri kullanılmıştır. Nested-PCR'ın birinci PCR ve ikinci PCR aşamalarında da uygulanan PCR reaksiyon karışımları (Tablo 3.9) ve amplifikasyon için gerekli PCR koşulları (Tablo 3.10) aynıdır. Nested-PCR sonucunda ürünler %1,5'lik jel elektroforezde 90 V'da 50 dakika süreyle yürütüldüğünde, Figueroa ve ark. (296) ve Oliveira-Sequeira ve ark. (297)'nın bildirdiği şekilde, *B. bovis* için ilk PCR sonunda 350 bp'lik, nested-

PCR sonunda 290 bp'lik bantlar; *B. bigemina* için ise ilk PCR sonunda 278 bp'lik, nested-PCR sonunda ise 170 bp'lik bantların görülmesi bu türler için pozitif olarak kabul edilmiştir.

Tablo 3.9. Nested-PCR'ın birinci ve ikinci PCR reaksiyonlarında kullanılan malzemeler ve miktarları

Malzemeler	**Miktarları** (µl)
10XTaq buffer (with $(NH_4)_2SO_4$, 1,25 ml)	5
$MgCl_2$ (25 mM)	4
dNTP Mix (10 mM each)	1
BOF/BOFN ve BILA/BILAN forward primerleri (100 pmol/ µl)	0,7
BOR/BORN ve BILB/BILBN reverse primerleri (100 pmol/ µl)	0,7
Taq DNA Polymerase (recombinant, 5 u/ µl, 500 u)	1
Deiyonize su	27,6
Genomik DNA	10
TOPLAM HACİM	50

Tablo 3.10. Nested-PCR'da amplifikasyon için gerekli şartlar

Siklus Sayısı	**Isı**	**Süre**
35 siklus	95 °C 57,5 °C 73 °C	2 dakika 1 dakika 90 saniye
1 siklus	72 °C	15 dakika

3.2.7. *Babesia bovis*'e Ait *msa-2c* Gen Primerleri ile Yapılan PCR

Hem RLB ile hem de Nested-PCR ile *Babesia bovis* olduğu kesin olarak tespit edilen DNA örnekleri, *B. bovis*'in yüzey antijeni olan ve aşı çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir gen bölgesi olan *msa-2c* antijenini amplifiye eden primerler kullanılarak tekrar PCR'a tabi tutulmuş ve PCR sonucunda jel elektroforezde görüntülenen yaklaşık 798 bp'lik bant, jel ekstraksiyon yöntemiyle kesilerek sekanslama için İontek firmasına gönderilmiştir. Bu gen bölgesini amplifiye eden primerler Borgonio ve ark. (269)'nın bildiridiği şekilde kullanılmıştır. *msa-2c* gen bölgesininin

amplifikasyonu için yapılan PCR'da kullanılan primerler Tablo 3.11'de, PCR reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 3.12'de ve amplifikasyon için gerekli koşullar Tablo 3.13'de gösterilmiştir.

Tablo 3.11. *msa-2c* primerleri ile uygulanan PCR'da kullanılan primerler

Primer Adı	**Primer Dizilimi (5'---3')**	**TM (^oC)**
MSA-2cF	ATGGTGTCTTTTAACATAATA	44,5
MSA-2cR	AAATGCAGAGAGAACGAAGTAGCAGAGAGT	60,7

Tablo 3.12. *msa-2c* primerleri ile uygulanan PCR'da kullanılan malzemeler ve miktarları

Malzemeler	**Miktarları** (µl)
10XTaq buffer (with $(NH_4)_2SO_4$, 1,25 ml)	5
$MgCl_2$ (25 mM)	6
dNTP Mix (10 mM each)	1
MSA-2cF primeri (100 pmol/ µl)	1
MSA-2cR primeri (100 pmol/ µl)	1
Taq DNA Polymerase (recombinant, 5 u/ µl, 500 u)	1
Deiyonize su	25
Genomik DNA	10
TOPLAM HACİM	50

Tablo 3.13. *msa-2c* primerleri ile uygulanan PCR'da amplifikasyon için gerekli şartlar

Siklus Sayısı	**Isı**	**Süre**
1 siklus	95 ^oC	30 saniye
35 siklus	95 ^oC 58 ^oC 72 ^oC	30 saniye 1 dakika 1 dakika
1 siklus	72 ^oC	10 dakika

msa-2c gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu sonucu %1,5'lik jel elektroforezde örneklerin görüntülenmesi ile görülen yaklaşık 798 bp'lik bant pozitif olarak kabul edilmiştir. Jel elektroforezde görüntülemeyi takiben bu 798 bp'lik bant, sekanslamaya gönderilmeden önce steril bistüri ucuyla kesilmiş ve jelden ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Jelden ekstraksiyon işleminin uygulanma sebebi; DNA dizilemesi esnasında sorun teşkil edebilecek non-spesifik bantların veya tuz, enzim gibi maddelerin elimine edilmesidir. Böylelikle DNA dizilemesi sonucu oluşan kromatogram görüntüsü yüksek kalite skorlu olmuştur.

3.2.8. Jelden Ekstraksiyon İşlemi

Babesia bovis pozitif numunelerin *msa-2c* gen bölgesini amplifiye eden primerle yapılan PCR sonucu ürünler, %1,5'lik agarozda yürütülmüştür. Jelin hazırlanmasında 1XTAE solusyonu kullanılmış ve dökülen jel donup elektroforez tankına yerleştirildikten sonra taraklar çıkarılmıştır. İlk kuyucuğa DNA ladder yüklenmiş diğer kuyucuklara da birer boşluk bırakılarak pozitif örneklere ait amplikonlar yüklenmiştir. Yükleme esnasında 10 µl amplikondan alınmış ve herbir amplikon yaklaşık 1 µl 6X loading dye ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Herbiri ayrı sığıra ait amplikonlar kuyucuklara, kontaminasyonu engellemek amacıyla birer boşluk verilerek uygulanmıştır. Ürünler UV ışın altında jel dökümentasyon sistemi ile görüntülenmiş ve 798 bp'lik bantlar ticari High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)'inin önerileri doğrultusunda jelden ekstrakte edilme aşamasına gelinmiştir. Jelden ekstraksiyon işleminin uygulanacağı ticari kitin içeriği Tablo 3.14'te verilmiştir.

Tablo 3.14. High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) İçeriği

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

Jelden ekstraksiyon işlemi ticari kitin önerileri doğrultusunda şu şekilde yapılmıştır:

1. 798 bp büyüklüğündeki bant jelden steril bir bistüri ucu yardımıyla kesilerek 1,5 ml'lik DNA'se RNA'se free bir tüp içerisine yerleştirmeden önce hassas terazide tüp boşken darası alındı.
2. Daha sonra kesilen jel parçası tüp içerisinde iken tekrar tartıldı ve böylelikle jelin ağırlığı hesaplanmış oldu.
3. Jel parçasının ağırlığına göre 100 mg ağırlığındaki jel parçası için 300 µl binding buffer olacak şekilde solusyon jel parçasının üzerine eklendi.
4. Ependorf tüpü 30 saniye vortekslendi.
5. Önceden 56 ^{o}C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde tüp 10 dakika inkubasyona bırakıldı. Her 2 dakikada bir ependorf tüpü vortekslendi.
6. Tüp içerisindeki agaroz jel parçası tamamen çözündükten sonra 100 mg ağırlığındaki jel parçası için 150 µl isopropanol olacak şekilde solusyon ilave edilerek tüp iyice vortekslendi.
7. Ticari kitin içeriğinde bulunan toplama tüpleri içerisine high pure filter tüpleri yerleştirildi. Ependorf tüpünün içerisindeki bütün sıvı pipet yardımıyla tamamen bu filtreli tüpün içerisine boşaltıldı.
8. Sıvıyı içeren tüp oda ısısında 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Alttaki toplama tüpüne süzülen sıvı boşaltıldı ve üstteki filtreli tüp tekrar aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
10. Özel filtresi sayesinde DNA'yı içine hapseden filtreli tüpün içerisine DNA'yı yıkama amacıyla 500 µl Wash buffer ilave edilerek 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Santrifügasyondan sonra alta süzülen sıvı uzaklaştırıldı ve filtreli tüp aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
12. İkinci yıkama amacıyla üzerine tekrar 200 µl Wash buffer ilave edilerek 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. İkinci yıkama ile sekanslamada muhtemelen problem teşkil edebilecek tuz ve enzim gibi maddeler uzaklaştırılmış oldu.

13. Alta süzülen sıvı tekrar uzaklaştırıldı. Filtreli tüp bu kez, yeni 1,5 ml'lik DNA'se RNA'se free bir tüp içerisine yerleştirildi.
14. Filtrede hapsolan DNA'yı alttaki ependorfa süzmek amacıyla 50 µl Elution buffer ilave edildi. 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek 1,5 ml'lik steril tüp içerisine süzülen sıvı DNA'yı ihtiva eden PCR ürünü olarak, sekanslamaya gönderilinceye kadar -20 ^{o}C'de muhafaza edildi.

3.2.9. Sekans Analizleri

Sekans analizi için; *Babesia bovis* yönünden pozitif bulunan; Amasya, Bartın, Bolu, Kastamonu, Trabzon ve Giresun'dan birer örnek, Karabük ve Samsun'dan ise ikişer örnek olmak üzere 8 farklı ilden toplam 10 örnek, *msa-2c* gen bölgeleri amplifiye edilip jelden ekstrakte edildikten sonra, primerlerle birlikte İontek İlaç, Tanı ve Biyoteknoloji Ürünleri Araştırma, Geliştirme Sanayi ve Ticaret A.Ş. (İstanbul) firmasına gönderilmiştir. Herbir örnek 50 µl hacimde, primerler ise herbir örnek için en az 10 µl hacimde olacak şekilde firmaya iletilmiştir. Primerlerin konsantrasyonları 5 µM olacak şekilde ayarlanmıştır. Örneklerin sekans analizleri çift yönlü olarak yaptırılmıştır. Dizilime sonuçları, BioEdit Sequence Alignment programı ile incelenerek örneklerin sekans dizilimleri ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen sekans dizilimlerinin internet ortamında Genbank'ta BLAST analizleri yapılarak Dünya'daki aynı suşlarla identiklik yüzdeleri belirlenmiştir. Örnekler Genebank'a kayıt ettirilmiş ve aksesyon numaraları alınmıştır. Örneklerin filogenetik analizleri ise Mega 4.1 programı ile yapılmıştır.

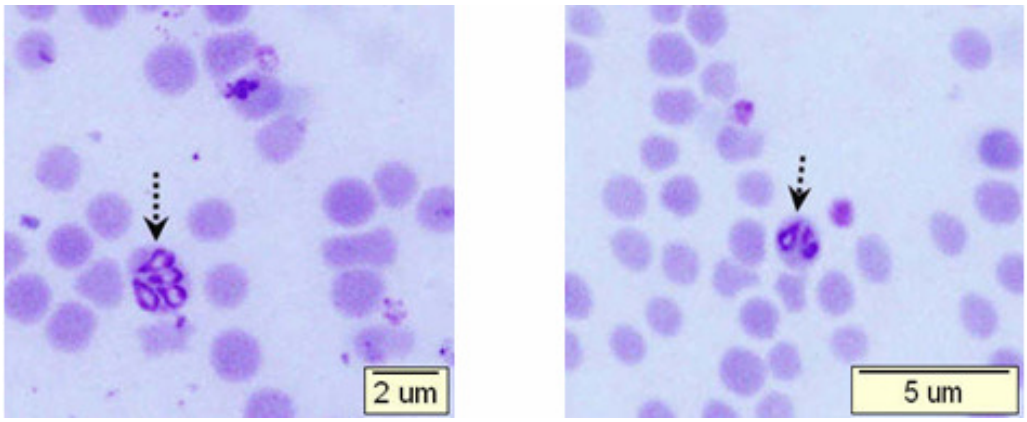
3.2.10. İstatistiksel Analiz

Sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin yayılışına yaşın ve ırkın etkisinin istatistiksel analizi için Pearson Chi-Square testi, cinsiyetin etkisi için ise Fisher’s Exact Testi kullanılmıştır. Bu istatistiksel testler için SPSS 13.0 programından yararlanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. MİKROSKOBİK BULGULAR

EDTA'lı kan örneklerinden hazırlanan kan frotileri %5'lik Giemsa solusyonu ile boyanmıştır. Frotiler üzerine immersiyon yağı damlatılarak mikroskobun x100'lük objektifinde en az 50 saha incelenmiştir. İnceleme esnasında *Babesia* ve *Theileria* türlerine ait bir piroplasmik formun (Şekil 4.1) görülmesi durumunda dahi preparat pozitif olarak değerlendirilmiştir. Mikroskobi sonuçlarının yerleşim yerlerine göre dağılımı Tablo 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Eritrosit içerisindeki *Babesia bovis* trofozoitleri (Bolu izolatı, Orijinal)

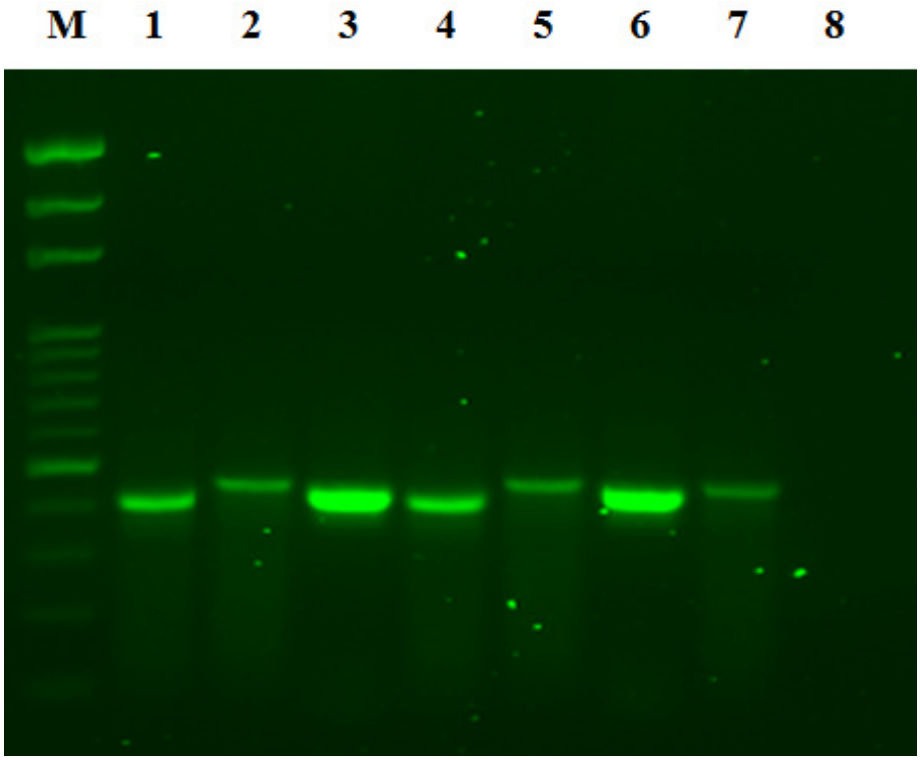
Tablo 4.1. Mikroskobik bakı sonuçlarının yerleşim yerlerine göre dağılımı

Yerleşim Yeri	İncelenen Sığır Sayısı	*Babesia* spp.		*Theileria* spp.	
		Sayı	%	Sayı	%
Amasya	25	1	4,0	-	-
Artvin	12	1	8,3	-	-
Bartın	43	-	-	3	7,0
Bolu	24	1	4,2	2	8,3
Çorum	32	-	-	2	6,3
Giresun	64	-	-	5	7,8
Karabük	148	3	2,0	23	15,5
Kastamonu	18	1	5,6	-	-
Ordu	26	-	-	1	3,8
Samsun	53	2	3,8	6	11,3
Tokat	36	-	-	2	5,6
Trabzon	46	-	-	5	10,9
Zonguldak	15	-	-	1	6,7
Toplam	542	9	1,7	50	9,2

Tablo 4.1'deki sonuçlara göre mikroskobik inceleme sonucunda; Karadeniz Bölgesi'nde babesiosis prevalansı %1,7 (9/542), theileriosis prevalansı ise %9,2 (50/542) olarak tespit edilmiştir. Yerleşim yerlerine göre mikroskobik sonuçlar değerlendirildiğinde; babesiosis Bartın, Çorum, Giresun, Ordu, Tokat, Trabzon ve Zonguldak'ta, theileriosis ise Amasya, Artvin ve Kastamonu'da tespit edilememiştir. Bunun yanında Amasya, Artvin, Bolu, Karabük, Kastamonu ve Samsun'da babesiosis prevalansının %2-8,3 arasında değiştiği, theileriosis prevalansının ise Bartın, Bolu, Çorum, Giresun, Karabük, Ordu, Samsun, Tokat, Trabzon ve Zonguldak'ta %3,8-15,5 arasında olduğu tespit edilmiştir.

4.2. PCR SONUÇLARI

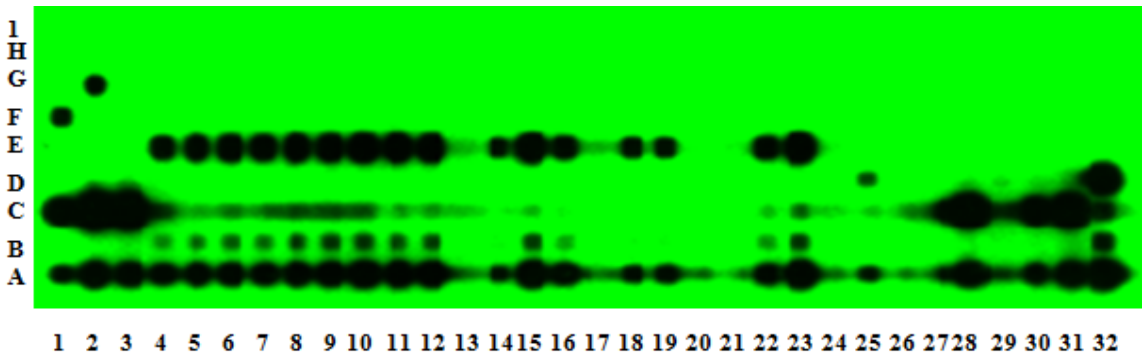
Reverse line blotting testinde kullanılacak amplikonları elde etmek amacıyla yapılan PCR reaksiyonunda *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S rRNA geninin değişken V4 bölgesinden büyüklüğü yaklaşık 390 ile 430 bp arasında değişen bir parçayı amplifiye eden genel primerler kullanılarak pozitif bulunan örneklerin %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2 *Theileria* ve *Babesia* türlerinin 18S rRNA gen bölgesinden ~390-430 bp'lik bölgenin amplifikasyonunun jel elektroforezde görünümü (Orijinal). M: Marker (100 bp); 1-6: Pozitif örnekler; 7: Pozitif kontrol; 8: Negatif kontrol

4.3. RLB SONUÇLARI

RLB testi ile incelenen toplam 542 sığıra ait kan numunelerinin sonuçları Şekil 4.3 ve Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Tablo 4.2'de ayrıca, mikroskobik inceleme sonuçları ile RLB sonuçları da kıyaslanmış ve mikroskobik incelemede soy bazında tespit edilen *Babesia* spp. ve *Theileria* spp.'nin RLB testi yapıldıktan sonra hangi türlere ait olduğu da gösterilmiştir.



Şekil 4.3. RLB sonuçlarının görüntüsü (Orijinal). (A) Catch-all, (B) *Theileria* spp., (C) *Babesia* spp., (D) *T. annulata*, (E) *T. orientalis*, (F) *B. bovis*, (G) *B. bigemina*, (H) *B. divergens*, (I) *B. major*; 1-31: Pozitif ve negatif örnekler, 32: Pozitif kontrol

RLB sonuçları değerlendirildiğinde; Karadeniz Bölgesi'nde *B. bovis* prevalansı %1,8, *B. bigemina* %2,2, *T. annulata* %2 ve *T. buffeli/orientalis* prevalansı da %20,6 olarak tespit edilmiştir. *Babesia divergens* ise tespit edilememiştir. Sonuçların yerleşim yerlerine göre sonuçları incelendiğinde ise; *B. bovis* prevalansının %1,4-5,6, *B. bigemina*'nın %1,9-16,7, *T. annulata*'nın %1,6-4,2 ve *T. buffeli/orientalis* prevalansının da %4-33,1 arasında değiştiği görülmüştür.

Tablo 4.2. RLB sonuçlarının yerleşim yerlerine göre dağılımı ve mikroskobik bakı ile kıyaslanması

Yerleşim Yeri	Sığır Sayısı	Mikroskobik bakı								RLB									
		B. bovis		*B. bigemina*		*T. annulata*		*T. orientalis*		*B. bovis*		*B. bigemina*		*B. divergens*		*T. annulata*		*T. orientalis*	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Amasya	25	-	-	1	4,0	-	-	-	-	1	4,0	1	4,0	-	-	-	-	1	4,0
Artvin	12	-	-	1	8,3	-	-	-	-	-	-	2	16,7	-	-	-	-	-	-
Bartın	43	-	-	-	-	-	-	3	7,0	1	2,3	-	-	-	-	1	2,3	8	18,6
Bolu	24	1	4,2	-	-	1	4,2	1	4,2	1	4,2	-	-	-	-	1	4,2	6	25,0
Çorum	32	-	-	-	-	-	-	2	6,3	-	-	-	-	-	-	-	-	7	21,9
Giresun	64	-	-	-	-	1	1,6	4	6,3	1	1,6	-	-	-	-	1	1,6	10	15,6
Karabük	148	1	0,7	2	1,4	3	2,0	20	13,5	2	1,4	6	4,1	-	-	5	3,4	49	33,1
Kastamonu	18	-	-	1	5,6	-	-	-	-	1	5,6	1	5,6	-	-	-	-	-	-
Ordu	26	-	-	-	-	1	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3,8	1	3,8
Samsun	53	1	1,9	1	1,9	-	-	6	11,3	2	3,8	1	1,9	-	-	1	1,9	11	20,8
Tokat	36	-	-	-	-	-	-	2	5,6	-	-	1	2,8	-	-	-	-	5	13,9
Trabzon	46	-	-	-	-	-	-	5	10,9	1	2,2	-	-	-	-	1	2,2	12	26,1
Zonguldak	15	-	-	-	-	-	-	1	6,7	-	-	-	-	-	-	-	-	2	13,3
Toplam	542	3	0,6	6	1,1	6	1,1	44	8,1	10	1,8	12	2,2	-	-	11	2,0	112	20,6

4.4. RLB SONUÇLARINA GÖRE EPİDEMİYOLOJİK FAKTÖRLERİN ANALİZİ

Bu analizde, epidemiyolojik faktörlerin RLB sonuçları temel alınmıştır. Sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin yayılışına yaşın etkisi incelendiğinde en yüksek *B. bovis* (%2) ve *T. buffeli/orientalis* (%25) prevalansının ≥6 yaş grubunda, *B. bigemina* (%2,8) prevalansının 3-5 yaş gurubunda ve *T. annulata* (%2,3) prevalansının ise ≤2 yaş grubunda görüldüğü belirlenmiştir. Yaş grupları arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır (p>0,05) (Tablo 4.3).

Babesia ve *Theileria* türlerinin yayılışına cinsiyetin etkisi incelendiğinde dişi sığırlarda enfeksiyon görülme oranlarının erkeklerde görülme oranlarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Dişilerde prevalans; *B. bovis* için %2, *B. bigemina* için %2,3, *T. annulata* için %2 ve *T. buffeli/orientalis* için %22,5 iken, erkeklerde bu oranlar sırasıyla %0,9, %1,8, %1,8 ve %13,5 olarak saptanmıştır. Cinsiyetin etkisi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; *T. buffeli/orientalis* ve toplam piroplasm enfeksiyonunun dişilerde erkeklere oranla daha yaygın olduğu görülmüş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0,05). Diğer türlerin dağılımı ile cinsiyet arasında ise istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır (p>0,05) (Tablo 4.4).

Sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin yayılışına ırkın etkisi incelendiğinde en yüksek prevalans; *B. bovis* için %2,8 ile yerli ırkta, *B. bigemina* için %3,2 ile holstein ırkında, *T. annulata* için %3,8 ile yerli ırkta ve *T. buffeli/orientalis* için %29,2 ile yerli ırkta tespit edilmiştir. Irkın etkisi istatistiksel olarak ele alındığında; *B. bovis, B. bigemina*, *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis* türlerine göre istatistiksel bir farklılık belirlenmemesine (p>0,05) karşın, toplamda piroplasmosis yerli ırklarda daha yaygın saptanmış ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0,05) (Tablo 4.5).

Tablo 4.3. Sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin yayılışına yaşın etkisi

Yaş Grupları (Yıl)	**İncelenen Sığır Sayısı**	***B. bovis***				***B. bigemina***				***T. annulata***				***T. buffeli/orientalis***				**Toplam**			
		Sayı	**%**	**χ^2**	**p**	**Sayı**	**%**	**χ^2**	**p**	**Sayı**	**%**	**χ^2**	**p**	**Sayı**	**%**	**χ^2**	**p**	**Sayı**	**%**	**χ^2**	**p**
≤2	132	2	1,5	0,12	0,94	2	1,5	0,66	0,71	3	2,3	0,06	0,96	25	18,9	3,59	0,16	32	24,2	2,99	0,22
3-5	214	4	1,9			6	2,8			4	1,9			38	17,8			52	24,3		
≥6	196	4	2,0			4	2,0			4	2,0			49	25,0			61	31,1		
Toplam	542	10	1,8			12	2,2			11	2,0			112	20,7			145	26,8		

χ^2: Pearson Chi-Square

Tablo 4.4. Sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin yayılışına cinsiyetin etkisi

Cinsiyet	**İncelenen Sığır Sayısı**	***B. bovis***				***B. bigemina***				***T. annulata***				***T. buffeli/orientalis***				**Toplam**			
		Sayı	**%**	**χ^2**	**p**	**Sayı**	**%**	**χ^2**	**p**	**Sayı**	**%**	**χ^2**	**p**	**Sayı**	**%**	**χ^2**	**p**	**Sayı**	**%**	**χ^2**	**p**
Dişi	431	9	2,0			10	2,3			9	2,0			97	22,5[a]			125	29,0[a]		
Erkek	111	1	0,9	0,68	0,69	2	1,8	0,11	1,00	2	1,8	0,03	1,00	15	13,5[b]	4,35	0,03	20	18,0[b]	5,43	0,02
Toplam	542	10	1,8			12	2,2			11	2,0			112	20,7			145	26,8		

χ^2: Fisher's Exact Test

[a,b]: Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir ($p<0,05$)

Tablo 4.5. Sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin yayılışına ırkın etkisi

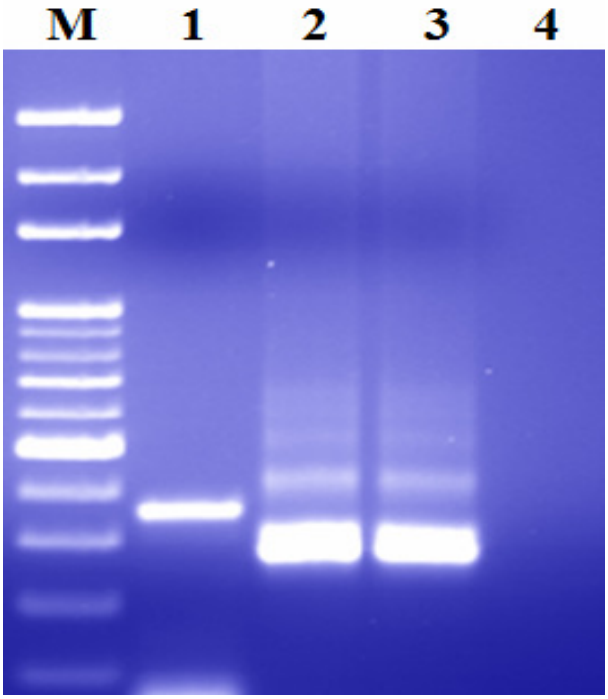
Irk	**İncelenen Sığır Sayısı**	***B. bovis***				***B. bigemina***				***T. annulata***				***T. buffeli/orientalis***				**Toplam**			
		Sayı	**%**	**χ^2**	**p**	**Sayı**	**%**	**χ^2**	**p**	**Sayı**	**%**	**χ^2**	**p**	**Sayı**	**%**	**χ^2**	**p**	**Sayı**	**%**	**χ^2**	**p**
Simental	100	1	1,0	1,32	0,72	2	2,0	1,03	0,79	1	1,0	1,77	0,62	21	21,0	7,35	0,11	25	25,0[a]	11,84	0,01
Holstein	185	5	2,7			6	3,2			4	2,2			32	17,3			47	25,4[a]		
Montafon	79	-	-			1	1,3			2	2,5			17	21,5			20	25,3[a]		
Jersey	72	1	1,4			-	-			-	-			11	15,3			12	16,7[a]		
Yerli	106	3	2,8			3	2,8			4	3,8			31	29,2			41	38,7[b]		
Toplam	542	10	1,8			12	2,2			11	2,0			112	20,7			145	26,8		

χ^2: Pearson Chi-Square

[a,b]: Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen gruplar arasındaki istatistiksel farklılık önemlidir ($p<0,05$)

4.5. NESTED-PCR SONUÇLARI

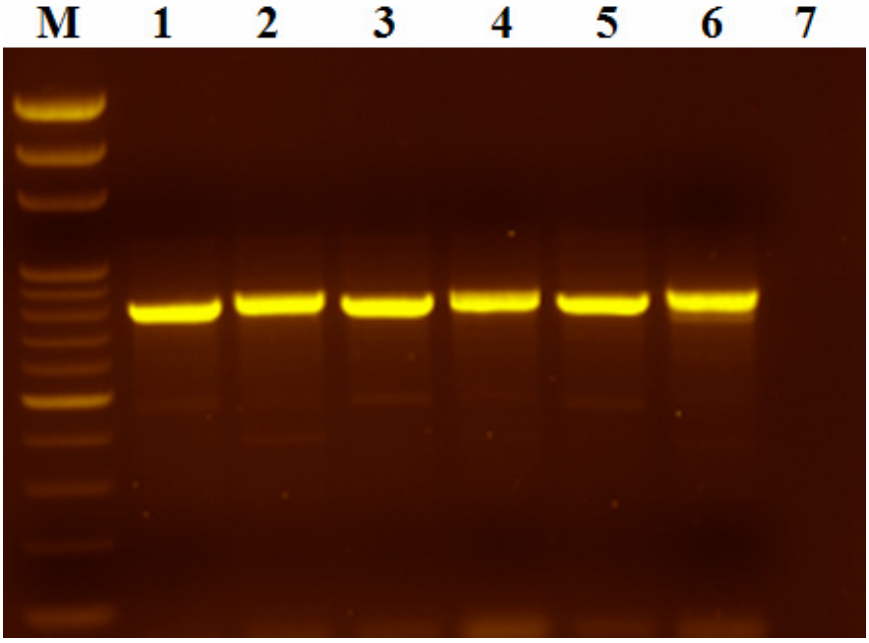
RLB testi sonuçlarının değerlendirilmesi aşamasında; üç örneğin *Babesia* spp. hattında pozitiflik verdiği görüldüğü halde, *B. bovis* ve/veya *B. bigemina* hattında herhangi bir siyah nokta (pozitifliğin göstergesi) oluşumu görülememiştir. DNA veya prob yoğunluğundan kaynaklanabileceği düşünülen bu şüpheli durum üzerine sadece bu üç örnek için RLB testine göre daha spesifik olan Nested-PCR yapılmıştır. Nested-PCR sonucunda bu üç örnekten birinin *B. bovis*, diğer ikisinin ise *B. bigemina* olduğu belirlenmiştir. Nested-PCR testinin ilk PCR aşamasının jel elektroforez sonuçları Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Buna göre Nested-PCR'ın birinci PCR aşamasında; *B. bovis* için 350 bp'lik bant, *B. bigemina* için ise 278 bp'lik bant jel elektroforezde görüntülenmiştir (Şekil 4.4).



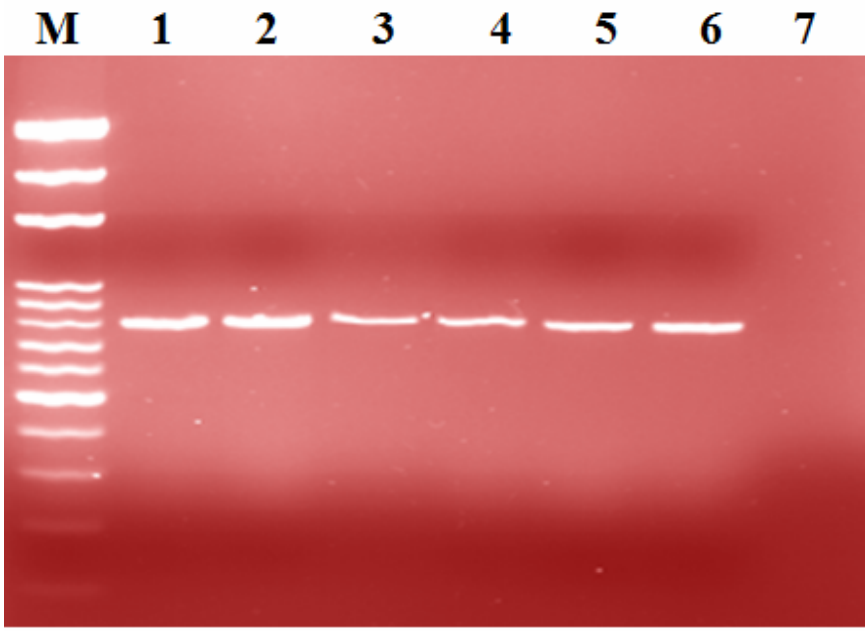
Şekil 4.4. *Babesia* türlerinin Nested-PCR sonucu jel elektroforezde görünümü (Orijinal). M: Marker (100 bp); 1: *B. bovis* pozitif örnek (350 bp); 2-3: *B. bigemina* pozitif örnek (278 bp); 4: Negatif kontrol

4.6. *BABESIA BOVIS*'E AİT *msa-2c* GEN PRİMERLERİ İLE YAPILAN PCR SONUÇLARI

RLB ve Nested-PCR testleri ile *Babesia bovis* olduğu kesin olarak tespit edilen DNA örnekleri, *B. bovis*'in yüzey antijeni olan *msa-2c* antijenini amplifiye eden primerler ile PCR'a tabi tutulmuştur. PCR sonucunda örneklerin jel elektroforezinde görülen ve sekanslama aşamasında sorun oluşturabilecek non-spesifik bantlar ile tuz vb. maddelerin elimine edilmesi için *msa-2c* gen bölgesine spesifik olan yaklaşık 798 bp'lik bant, jel ekstraksiyon yöntemiyle kesilerek sekanslama için hazır hale getirilmiştir. *msa-2c* primerleri ile yapılan PCR'ın jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.5'te, jelden ekstraksiyon aşaması sonrası fotoğraflanan görüntüler ise Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.5. *Babesia bovis* pozitif örneklerin *msa-2c* primeri ile PCR'ı sonucu jel elektroforezde görünümü (Orijinal). M: Marker (100 bp); 1-6: *B. bovis* pozitif örnekler (798 bp); 7: Negatif kontrol



Şekil 4.6. *Babesia bovis* pozitif örneklerin 798 bp büyüklüğündeki bantlarının kesilerek jelden ekstraksiyonu sonucu elektroforezde görünümü (Orijinal). M: Marker (100 bp); 1-6: *B. bovis* pozitif örnekler (798 bp); 7: Negatif kontrol

4.7. SEKANS ANALİZİ SONUÇLARI

Karadeniz Bölgesi'ndeki sığırlardan elde edilen ve *Babesia bovis* olduğu tespit edilen toplam 10 örnek sekans analizleri için İontek Firması'na gönderilmiştir. Sekans analizleri *msa-2c* primerleri ile çift yönlü olarak yaptırılmıştır. İontek Firması tarafından kromatogram görüntüleriyle birlikte gönderilen sekans sonuçlarının alignmentları BioEdit programı ile yapılmıştır. Elde edilen sekansların GenBank'a kayıtları yapılmış ve aksesyon numaraları alınmıştır. GenBank'a kayıtları yapılan Amasya, Bartin, Bolu, Giresun, Karabuk (4107), Karabuk-2, Kastamonu, Samsun-1, Samsun-2 ve Trabzon suşlarının *msa-2c* gen dizilimleri BLAST programı ile Dünya'daki kayıtlı diğer sekanslarla kıyaslanmıştır. Kıyaslama sonucunda 10 örneğin kendi aralarında %94-99 oranında identik oldukları belirlenmiştir (Tablo 4.6). Bu örneklerin Dünya'daki diğer örneklerle kıyaslaması yapıldığında ise *msa-2c* grubundaki sekanslarla %89-99 oranında benzerlik gösterdikleri görülmüştür. Sekansları elde edilen pozitif örneklerin GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.7'de, nükleotid ve protein sekansları ise Şekil 4.7-4.16'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Karadeniz Bölgesi izolatlarının kendi aralarındaki maksimum identiklik oranları

İzolatlar		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amasya	1	100	95	95	95	96	95	94	95	95	94
Bartin	2		100	97	97	98	97	96	98	97	95
Bolu	3			100	96	97	97	99	97	96	95
Giresun	4				100	97	97	96	98	97	95
4107	5					100	98	97	98	97	96
Karabuk-2	6						100	97	97	96	96
Kastamonu	7							100	96	96	95
Samsun-1	8								100	98	96
Samsun-2	9									100	95
Trabzon	10										100

Tablo 4.7. *Babesia bovis* pozitif izolatların GenBank aksesyon numaraları

İzolat	**Gen bölgesi**	**Konak**	**Parazit**	**Aksesyon Numarası**
Amasya	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	GU647150
Bartin	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	GU647149
Bolu	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	GU357634
Giresun	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	GU647154
Karabuk (4107)	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	GU004533
Karabuk-2	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	GU647147
Kastamonu	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	GU647148
Samsun-1	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	GU647152
Samsun-2	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	GU647153
Trabzon	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	GU647151

Nükleotid Sekansı

```
ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGTTGCATTCTGCTCCATCCTTTTCAATTATGCAGTGGCATCTCCAC
AAGAGGAGGCTGTACCAACTAAGCAGGTGAATGGGAGTTATTTACTGTTTGATGATATGAAAATGTTTTA
TGATGTAATGCGCAGCAATGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATCATGAGGCTGTTGGC
ATGGAAGCTACATCGGCTACTAAAACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATG
CACCTTTCAACACATCGGACTATGACACACTCGATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTTATGAAGAGCT
GTTGAAGCTTCTGATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACTAACTCTACTGTGGGA
GAGAGTGCAGAACATTCCAATAACGTACACACCGAGTTGAGAAAATACTACTGGGATAATATTTACGATG
ACCATTGTCAATATAATAAGGACAACGGAAGCAACCTTTACAAGGTATTCATCACTAATTCTGCCGCTTT
GAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAGCATTCGAAACAAGGAAAGCTCAAAAGAATGACTACAGATTTATC
AATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATACTGCAGCACAACCTC
CCAAGCCTGCTGAGACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCATTCACCTATGGCGGATTGACTGTGGCCACTCT
CTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
```

Protein Sekansı

```
MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPQEEAVPTKQVNGSYLLFDDMKMFYDVMRSNDESMLKSILEKNHEAVG
MEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNTSDYDTLDLEYLSGQSYEELLKLLIEAIYGMEIIIEKTNSTVG
ESAEHSNNVHTELRKYYWDNIYDDHCQYNKDNGSNLYKVFITNSAALRIASEELRAFETRKAQKNDYRFI
NPSSTPEPETSSPSHGENTAAQPPKPAETPKPTGSSFTYGGLTVATLCYFVLSAF
```

Şekil 4.7. Amasya izolatının sekans dizilimleri (GU647150)

Nükleotid Sekansı

```
ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGTTGCATTCTGCTCCATCCTTTTCAATTATGCAGTGGCATCTCCAC
AAGAGGAGGCTGTACCAACTAAGCAGGTGAATGGGAGTCATTTACTGTTTGATGATATGAAAATGTTGTA
TGATGTAATGCGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGGATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGC
ATGGAAGCTACATCGGCTACTAAAACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATG
CACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTCGATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTCCTGAAGAGCT
GCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGA
GAGAGTGCAGAACATTCCAATAACGTAGACACCGAGTTGAGAAAATACTACTGGGATAATATTTACGATG
ACCAGAGTGACTATAATATGGACAAATTAAGCAACCTTTACAAGGCATTCATCACTAATTCTGCTGCTTT
GAGAATCGCATTTAAGGATCTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAAAAGAATGACTACAGATTTATC
AATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATACTGCAGCACAACCTC
CCAAGCCTGCCGAGACCCCTAAGCATACTGGATCTTCATTCACCTTCGGCGGATTGACTGTGGCTACTCT
CTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
```

Protein Sekansı

```
MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPQEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKRILEKNFEAVG
MEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNTSDFDTLDLEYLSGQSPEELLKLLIEAIYGMEIIIEKTNSFVG
ESAEHSNNVDTELRKYYWDNIYDDQSDYNMDKLSNLYKAFITNSAALRIAFKDLRKFETRKAQKNDYRFI
NPSSTPEPETSSPSHGENTAAQPPKPAETPKHTGSSFTFGGLTVATLCYFVLSAF
```

Şekil 4.8. Bartin izolatının sekans dizilimleri (GU647149)

Nükleotid Sekansı

```
ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGTTGCATTCTGCTCCATCCTTTTCAATTATACAGTGGCATCTCCAC
AAGAGGAGGCTGTACCAACTAAGCAGGTGAATGGGAGTCATTTACTGTTTGATGATATGAAAATGTTGTA
TGATGTAATGCGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAGAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGC
ATGGAAGCTACATCGGCTACTAAAACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATG
CACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTCGATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCT
GCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGA
GAGAGTGCAGAACATTCCAATAACGTAGACACCGAGTTGAGAAAATACTACTGGGATAATATTTACGATG
ACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAATTAAGCAACCTTTACAAGGCATTCATCACTAATTCTGCCGCTTT
GAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAAAAGAATGACTACAGATTTATC
AATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATACTACAGCACAACCTC
CCAAGCCTGCCGAGACCCCTAAGCCTACTGGATCTTTTTCACCTTCGTCCGGTTATACTGTTTTTACTCT
CTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
```

Protein Sekansı

```
MVSFNIITVAFCSILFNYTVASPQEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKSILEKNFEAVG
MEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNTSDFDTLDLEYLSGQSNEELLKLLIEAIYGMEIIIEKTNSFVG
ESAEHSNNVDTELRKYYWDNIYDDQSEYNKDKLSNLYKAFITNSAALRIASEELRKFETRKAQKNDYRFI
NPSSTPEPETSSPSHGENTTAQPPKPAETPKPTGSFSPSSGYTVFTLCYFVLSAF
```

Şekil 4.9. Bolu izolatının sekans dizilimleri (GU357634)

Nükleotid Sekansı

```
ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGTTGCATTCTGCTCCATCCTTTTCAATTATGCAGTGTCATCTCCAC
AAGAGGAGGCTGTACCAACTAAGCAGGTGAATGGGAGTCATTTACTGTTTGATGATATGAAAATGTTGTA
TGATGTAATGCGCAGCATCCATGAAAGCATGTTGAAAAGGATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGC
ATGGAAGCTACATCGGCTACTAAAACACATGACGCTCTGAAAACTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATG
CACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTCGATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATGTAATGAAGAGCT
GCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGA
AAGAGTGCAGAACATTCCAATAACGTAGACACCGAGTTGAGAAAATACTACTGGGATAATATTTACGATG
ACCAGAGTGACTATATTATGGACAAATTAAGCAACCTTTACAAGGCATTCATCACTAATTCTGCCGCTTT
GAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAAAAGAATGACTACAGATTTATC
AATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAATATACTGCAGCACAACCTC
CCAAGCCCGCCGAGACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCATTCACCTTCGGCGGATTGACTGTGGCCACTCT
CTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
```

Protein Sekansı

```
MVSFNIITVAFCSILFNYAVSSPQEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIHESMLKRILEKNFEAVG
MEATSATKTHDALKTVKQLIKTDAPFNTSDFDTLDLEYLSGQCNEELLKLLIEAIYGMEIIIEKTNSFVG
KSAEHSNNVDTELRKYYWDNIYDDQSDYIMDKLSNLYKAFITNSAALRIASEELRKFETRKAQKNDYRFI
NPSSTPEPETSSPSHGEYTAAQPPKPAETPKPTGSSFTFGGLTVATLCYFVLSAF
```

Şekil 4.10. Giresun izolatının sekans dizilimleri (GU647154)

Nükleotid Sekansı

```
ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGTTGCATTCTGCTCCATCCTTTTCAATTATGCAGTGGCATCTCCAC
AAGAGGAGGCTGTACCAACTAAGCAGGTGAATGGGAGTCATTTACTGTTTGATGATATGAAAATGTTGTA
TGATGTAATGCGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGC
ATGGAAGCTACATCGGCTACTAAAACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATG
CACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTCGATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTCCCGAAGAGCT
GCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGA
GAGAGTGCAGAACATTCCAATAACGTAGACACCGAGTTGAGAAAATACTACTGGGATAATATTTACGATG
ACCAGAGTGAATATAATATGGACAAATTAAGCAACCTTTACAAGGCATTCATCACTAATTCTGCTGCTTT
GAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAAAAGAATGACTACAGATTTATC
AATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATACTGCAGCACAACCTC
CCAAGCCTGCCGAGACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCATTCACCTTCGGCGGATTGACTGTGGCTACTCT
CTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
```

Protein Sekansı

```
MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPQEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKSILEKNFEAVG
MEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNTSDFDTLDLEYLSGQSPEELLKLLIEAIYGMEIIIEKTNSFVG
ESAEHSNNVDTELRKYYWDNIYDDQSEYNMDKLSNLYKAFITNSAALRIASEELRKFETRKAQKNDYRFI
NPSSTPEPETSSPSHGENTAAQPPKPAETPKPTGSSFTFGGLTVATLCYFVLSAF
```

Şekil 4.11. Karabuk (4107) izolatının sekans dizilimleri (GU004533)

Nükleotid Sekansı

```
ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGTTGCATTCTGCTCCATCCTTTTCAATTATTCAGTGGCATCTCCAC
AAGAGGAGGCTGTACCAACTAAGCAGGTGAATGGGAGTCATTTACTGTTTGATGATATGAAAATGTTGTA
TGATGTAATGCGCAGCATTGATGTAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGC
ATGGAAGCTACATCGGCTACTAAAACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATG
CACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTCGATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTTATGAAGAGCT
GCTCATACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGA
GAGAGTGCAGAACATTCCAATAACGTAGACACCGAGTTGAGAAAATACTACTGGGATAATATTTACGATG
ACCAGAGTGAATATAATATGGACAAATTAAGCAACCTTTACAAGGCATTCATCACTAATTCTGCTGCATT
GAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAAAAGAATGACTACAGATTTATC
AATGCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAAAATACTGCAGCACAACCTC
CCAAGCCTGCCGAGACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCTTTCACCTTCGGCGGATTGACTGTGTCTACTCT
CTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
```

Protein Sekansı

```
MVSFNIITVAFCSILFNYSVASPQEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDVSMLKSILEKNFEAVG
MEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNTSDFDTLDLEYLSGQSYEELLILLIEAIYGMEIIIEKTNSFVG
ESAEHSNNVDTELRKYYWDNIYDDQSEYNMDKLSNLYKAFITNSAALRIASEELRKFETRKAQKNDYRFI
NASSTPEPETSSPSHGENTAAQPPKPAETPKPTGSSFTFGGLTVSTLCYFVLSAF
```

Şekil 4.12. Karabuk-2 izolatının sekans dizilimleri (GU647147)

Nükleotid Sekansı

```
ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGTTGCATTCTGCTCCATCCTTTTCAATTATACAGTGGCATCTCCAC
AAGAGGAGGCTGTACCAACTAAGCAGGTGAATGGGAGTCATTTACTGTTTGATGATATGAAAATGTTGTA
TGATGTAATGCGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAGAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGC
ATGGAAGCTACATCGGCTACTAAAACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATG
CACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTCGATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCT
GCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAGTCATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGA
GAGAGTGCAGAACATTCTAATAACGTAGACACCGAGTTGAGAAAATACTACTGGGATAATATTTACGATG
ACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAATTAAGCAACCTTTACAAGGCATTCATCACTAATTCTGCCGCTTT
GAGAATCGCATCGGAGGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAAAAGAATGACTACAGATTTATC
AATCCTTCTTCAACACCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGATTATACTACAGCACAACCTC
CCAAGCCTGCGGAGACCCCTAAGCCTACTGGATCTTTTTCACCTTCGTCCGGTTATACTGTTTTTACTCT
CTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
```

Protein Sekansı

```
MVSFNIITVAFCSILFNYTVASPQEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKSILEKNFEAVG
MEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNTSDFDTLDLEYLSGQSNEELLKLLIEAIYGMEVIIEKTNSFVG
ESAEHSNNVDTELRKYYWDNIYDDQSEYNKDKLSNLYKAFITNSAALRIASEGLRKFETRKAQKNDYRFI
NPSSTPEPETSSPSHGDYTTAQPPKPAETPKPTGSFSPSSGYTVFTLCYFVLSAF
```

Şekil 4.13. Kastamonu izolatının sekans dizilimleri (GU647148)

Nükleotid Sekansı

```
ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGTTGCATTCTGCTCCATCCTTTTCAATTATGCAGTGGCATCTCCAC
AAGAGGAGGCTGTACCAACTAAGCAGGTGAATGGGAGTCATTTACTGTTTGATGATATGAAAATGTTGTA
TGATGTAATGCGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGGATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGC
ATGGAAGCTACATCGGCTACTAAAACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATG
CACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTCGATTTGGAATATCTCTCAGGGCAATCTCCTGAAGAGCT
GCTCAAACTGCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACTAACTCTTTTGTGGGA
AAGAGTGCAGAACATTCCAATAACGTAGACACCGAGTTGAGAAAATACTACTGGGATAATATTTACGATG
TCCAGAGTGAATATAATAAGGACAAATTAAGCAACCTTTACAAGGCATTCATCACTAATTCTGCCGCTTT
GAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAAAAGAATGACTACAGATTTATC
AATCCTTCTTCAACAGCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAATATACTGCAGCACAACCTC
CCAAGCCTGCCGAGACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCATTCACCTTCGGCGGATTGACTGTGGCCACTCT
CTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
```

Protein Sekansı

```
MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPQEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKRILEKNFEAVG
MEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNTSDFDTLDLEYLSGQSPEELLKLLIEAIYGMEIIIEKTNSFVG
KSAEHSNNVDTELRKYYWDNIYDVQSEYNKDKLSNLYKAFITNSAALRIASEELRKFETRKAQKNDYRFI
NPSSTAEPETSSPSHGEYTAAQPPKPAETPKPTGSSFTFGGLTVATLCYFVLSAF
```

Şekil 4.14. Samsun-1 izolatının sekans dizilimleri (GU647152)

Nükleotid Sekansı

```
ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGTTGCATTCTGCTCCATCCTTTTCAATTATGCAGTGGCATCTCCAC
AAGAGGAGGCTGTACCAACTAAGCAGGTGAATGGGAGTCATTTACTGTTTGATGATATGAAAATGTTGTA
TGATGTAATGCGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGGATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGC
ATGGAAGCTACATCGGCTACTAATACACATGACGCTCTGAAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATG
CACCTTTCAACACATCGGACTTTGACACACTCGATTTGCAATATCTCTCAGGGCAATTTCATGAAGAGCT
GCTCAAACTGCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATCATAATTGAAATAACTAACTCTTTTGTGGGA
AAGAGTGCAGAACATTCCAATAACGTAGACACCGAGTTGAGAAAATACTACTGGGATAATATTTACGATG
ACCAGAGTGAATATGATAAGGACAAATTAAGCAACCTTTACAAGGCATTCATCACTAATTCTGCCGCTTT
GAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAATATTCGAAACAAGGATAGCTCAAAAGAATGACTACAGATTTATC
AATCCTTCTTCAAGAGCGGAACCCGAAACATCCTCTCCATCGCATGGAGAATATACTGCAGCACAACCTC
CCAAGCCTGCCGAGACCCCTAAGCCTACTGGATCTTCATTCACCTTCGGCGGATTGACTGTGGCCACTCT
CTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
```

Protein Sekansı

```
MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPQEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKRILEKNFEAVG
MEATSATNTHDALKAVKQLIKTDAPFNTSDFDTLDLQYLSGQFHEELLKLLIEAIYGMEIIIEITNSFVG
KSAEHSNNVDTELRKYYWDNIYDDQSEYDKDKLSNLYKAFITNSAALRIASEELRIFETRIAQKNDYRFI
NPSSRAEPETSSPSHGEYTAAQPPKPAETPKPTGSSFTFGGLTVATLCYFVLSAF
```

Şekil 4.15. Samsun-2 izolatının sekans dizilimleri (GU647153)

Nükleotid Sekansı

```
ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGTTGCATTCTGCTCCATCCTTTTCAATTATGCAGTGGCATCTCCAC
AAGAGGAGGCTGTACCAACTAAGCAGGGCGATGGGAGTCATTTACTGTTTGATGATATGATACTGTTCTA
TGATGTGATGCGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAGCATTCTTGAGAAGAATTTTGAGGCTGTTGGC
ATGGAAGCTACATCGGCTACTAAAACACATGACGCTCTGGAGGCTGTAAAACAATTAATCAAAACCGATG
CACCTTTCAATGTATCGGACTTTGACACACTCGATATGGAATATCTCTCAGGGCAATCTAATGAAGAGCT
GCTCAAACTTCTCATTGAGGCAATATATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACTAACTCTTATGTGGGA
GAGAGTGCAGAACATTCCAATAACGTAGACACCGAGTTGAGAAAATACTACTGGGATAATATTTACGATG
ACCAGAGTGAATATAATAAGGACAAATTAAGCAACCTTTACAAGGCACGCATCACTAATTCTGCCGCTTT
GAGAATCGCATCGGAGGAACTTAGAAAATTCGAAACAAGGAAAGCTCAAAAGAATGACTACAGATGTATC
AATCCTTCTTCAACACCGGATACCGAAACATCAACTCCATCGCATGGAGAAAATACTGCAGCACAACCTC
CCAAGCCTGCCGAGACCCCTAAGCCTACCGGATCTTCTTTCACCTTCGGCGGATTGACTGTGGCCACTCT
CTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
```

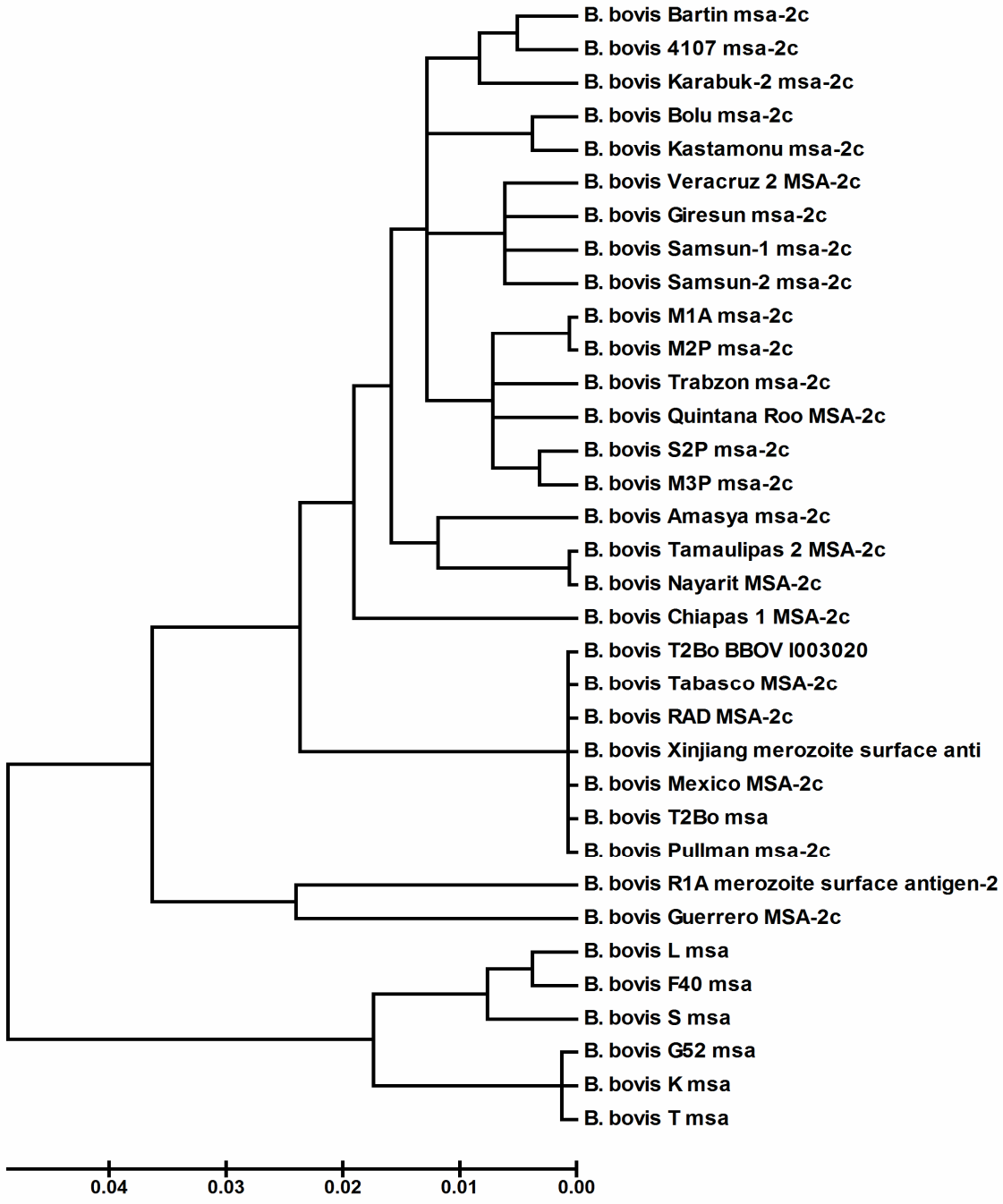
Protein Sekansı

```
MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPQEEAVPTKQGDGSHLLFDDMILFYDVMRSIDESMLKSILEKNFEAVG
MEATSATKTHDALEAVKQLIKTDAPFNVSDFDTLDMEYLSGQSNEELLKLLIEAIYGMEIIIEKTNSYVG
ESAEHSNNVDTELRKYYWDNIYDDQSEYNKDKLSNLYKARITNSAALRIASEELRKFETRKAQKNDYRCI
NPSSTPDTETSTPSHGENTAAQPPKPAETPKPTGSSFTFGGLTVATLCYFVLSAF
```

Şekil 4.16. Trabzon izolatının sekans dizilimleri (GU647151)

4.8. SEKANS ANALİZ SONUÇLARININ FİLOGENETİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Sekans analizleri yapılan izolatların, Dünya'daki diğer izolatlarla yakınlıkları Mega 4.1 programı vasıtasıyla filogenetik ağaç şeklinde Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. İzolatların *msa-2c* gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbor-joining)

Karadeniz Bölgesi'nden elde edilen izolatlarla kıyaslaması yapılan Dünya'daki diğer *msa-2c* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank'tan alınarak Tablo 4.8'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. Kıyaslaması yapılan diğer *B. bovis* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	Orijin	Gen	Konak	Parazit	Aksesyon Numarası
G52	Queensland/Avustralya	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	DQ173969
T	Queensland/Avustralya	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	DQ173973
K	Queensland/Avustralya	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	DQ173970
S	Queensland/Avustralya	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	DQ173972
F40	Queensland/Avustralya	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	DQ173965
L	New South Wales/Avustralya	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	DQ173971
T2Bo	Teksas/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	DQ173974
T2Bo BBOV_ I003020	Teksas/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	XM_001608902
R1A	Arjantin/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	AY052542
M2P	Arjantin/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	FJ411372
S2P	Arjantin/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	FJ422796
M3P	Arjantin/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	FJ422794
M1A	Arjantin/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	FJ422795
Xinjiang	Çin/Asya	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	EU328267
Guerrero	Meksika/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	EF640967
Chiapas 1	Meksika/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	EF640957
Tamaulipas 2	Meksika/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	EF640961
Nayarit	Meksika/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	EF640965
Quintana Roo	Meksika/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	EF640959
Pullman	Meksika/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	FJ422797
Tabasco	Meksika/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	EF640964
RAD	Meksika/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	FJ422799
Mexico	Meksika/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	EF640956
Veracruz 2	Meksika/Amerika	*msa-2c*	Sığır	*Babesia bovis*	EF640963

Bütün izolatların *msa-2c* gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Mega 4.1 programı kullanılarak elde edilmiş ve Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9. *Babesia bovis* izolatların *msa-2c* gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları

İzolatlar	**A (%)**	**C (%)**	**G (%)**	**T (%)**	**A+T (%)**	**G+C (%)**	**Toplam nükleotid**
Amasya	32,2	21,3	19,8	26,7	58,9	41,1	798
Bartin	32	21,2	19,4	27,4	59,4	40,6	798
Bolu	32,3	21,2	18,9	27,6	59,9	40,1	798
Giresun	32,2	21,7	19,2	26,9	59,1	40,9	798
Karabuk (4107)	32	21,6	19,5	26,9	58,9	41,1	798
Karabuk-2	31,8	21,1	19,4	27,7	59,5	40,5	798
Kastamonu	31,8	20,9	19,4	27,9	59,7	40,3	798
Samsun-1	32	21,4	19,8	26,8	58,8	41,2	798
Samsun-2	31,6	21,2	19,9	27,3	58,9	41,1	798
Trabzon	32	21,5	20,2	26,3	58,3	41,7	798
G52	32,1	20,7	19,5	27,7	59,8	40,2	798
T	32	20,8	19,6	27,6	59,6	40,4	798
K	32,1	20,9	19,6	27,4	59,5	40,5	798
S	32,1	20,9	19,1	27,9	60	40	798
F40	31,7	20,7	19,7	27,9	59,6	40,4	798
L	31,8	20,8	19,5	27,9	59,7	40,3	798
T2Bo	31,7	20,9	20,1	27,3	59	41	798
T2Bo BBOV_ I003020	31,8	20,8	20,1	27,3	59,1	40,9	798
R1A	32,1	21,2	19,4	27,3	59,4	40,6	798
M2P	32,2	21,7	19,6	26,5	58,7	41,3	795
S2P	32,1	21,9	19,5	26,5	58,6	41,4	795
M3P	32,1	21,5	19,6	26,8	58,9	41,1	795
M1A	32,2	21,8	19,6	26,4	58,6	41,4	795
Xinjiang	31,8	20,9	20,1	27,2	59	41	798
Guerrero	31,6	20,8	19,4	28,2	59,8	40,2	798
Chiapas 1	32,3	21,3	19,2	27,2	59,5	40,5	798
Tamaulipas 2	32,3	20,8	19,8	27,1	59,4	40,6	798
Nayarit	32,2	20,8	19,9	27,1	59,3	40,7	798
Quintana Roo	32	21,7	19,6	26,7	58,7	41,3	798
Pullman	31,4	21	20,4	27,2	58,6	41,4	795
Tabasco	31,8	20,8	20,1	27,3	59,1	40,9	798

RAD	31,8	20,8	20,1	27,3	59,1	40,9	798
Mexico	31,7	20,8	20,2	27,3	59	41	798
Veracruz 2	32,5	21,2	19,5	26,8	59,3	40,7	798

Karadeniz Bölgesi'ndekin elde edilen *B. bovis* izolatları ile Dünya'daki benzer *B. bovis* izolatlarının, Clustal X2 programı kullanılarak *msa-2c* gen bölgesine göre kendi aralarındaki alingmentları yapılmış ve Şekil 4.18 gösterilmiştir. Bu sayede akrabalık dereceleri karşılaştırılan bütün izolatların ortak ve farklı nükleotit bölgeleri aynı anda gösterilmiştir.

```
                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        5         15         25         35         45         55
Amasya              ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
Bartin              ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
Bolu                ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATACAGTG
Giresun             ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
4107                ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
Karabuk-2           ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATTCAGTG
Kastamonu           ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATACAGTG
Samsun-1            ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
Samsun-2            ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
Trabzon             ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
R1A                 ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAC TTATACATTG
Guerrero            ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAC TTATACATTG
Chiapas_1           ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAC TTATACATTG
M2P                 ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
Tamaulipas_2        ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
Nayarit             ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
Quintana_Roo        ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
S2P                 ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
M3P                 ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
M1A                 ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
Pullman             ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
Tabasco             ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
RAD                 ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
T2Bo_BBOV           ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
Xinjiang            ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTCTTCAA TTATGCAGTG
Mexico              ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
Veracruz_2          ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
T2Bo                ATGGTGTCTT TTTACATAAT AACCGTTGCA TTCTGCTCCA TCCTTTTCAA TTATGCAGTG
L                   ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTGGCA TTGTGTTCCA CCCTTTTAAA TTCAACATTG
F40                 ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTGGCA TTGTGTTCCA CCCTTTTAAA TTCAACATTG
S                   ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTGGCA TTGTGTTCCA CCCTTTTAAA TTCAACATTG
K                   ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTGGCA TTGTGTTCCA CCCTTTTAAA TGCAACATTG
T                   ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTGGCA TTGTGTTCCA CCCTTTTAAA TGCAACATTG
G52                 ATGGTGTCTT TTAACATAAT AACCGTGGCA TTGTGTTCCA CCCTTTTAAA TGCAACATTG
Clustal Consensus   ********** ** ******* ****** *** ** ** ****  *** ** *  *    ** **

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        65         75         85         95        105        115
Amasya              GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTTA TTTACTGTTT
Bartin              GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Bolu                GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Giresun             TCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
4107                GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Karabuk-2           GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Kastamonu           GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Samsun-1            GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Samsun-2            GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Trabzon             GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGGCG ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
R1A                 GCATCTCCAC AAGAGAAGAC TGTACCAACT AAACAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTCT
Guerrero            GCATCTCCAC AAGAGAAGAC TGTACCAACT AAACAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Chiapas_1           GCATCTCCAC AAGAGAAGAC TGTACCAACT AAACAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
M2P                 GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Tamaulipas_2        GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTTA TTTACTGTTT
Nayarit             GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTTA TTTACTGTTT
Quintana_Roo        GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
S2P                 GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
M3P                 GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
M1A                 GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Pullman             GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Tabasco             GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
RAD                 GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
T2Bo_BBOV           GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Xinjiang            GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Mexico              GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Veracruz_2          GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
T2Bo                GCATCTCCAC AAGAGGAGGC TGTACCAACT AAGCAGGTGA ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
L                   GCACCTCCAC AAGAGAAGAA TGTACCATCT AAGCATGCTT ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
F40                 GCATCTCCAC AAGAGAAGAA TGTACCATCT AAGCATGCTT ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
S                   GCATCTCCAC AAGAGAAGAA TGTACCATCT AAGCATGCTT ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
K                   GCATCTCCAC AAGAGAAGAA TGTACCATCT AAGCATGCTT ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
T                   GCATCTCCAC AAGAGAAGAA TGTACCATCT AAGCATGCTT ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
G52                 GCATCTCCAC AAGAGAAGAA TGTACCATCT AAGCATGCTT ATGGGAGTCA TTTACTGTTT
Clustal Consensus    ** ****** ***** **   ******* ** ** ** *    ******** * ******** *
```

Şekil 4.18. *Babesia bovis* izolatlarının *msa-2c* gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin kıyaslanması

```
                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       125        135        145        155        165        175
Amasya              GATGATATGA AAATGTTTTA TGATGTAATG CGCAGCAATG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
Bartin              GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGG
Bolu                GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAGAGC
Giresun             GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATCC ATGAAAGCAT GTTGAAAAGG
4107                GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
Karabuk-2           GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGTAAGCAT GTTGAAAAGC
Kastamonu           GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAGAGC
Samsun-1            GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGG
Samsun-2            GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGG
Trabzon             GATGATATGA TACTGTTCTA TGATGTGATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
R1A                 GATGATATGA AAATGTTTTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
Guerrero            GATGATATGA AAATGTTTTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
Chiapas_1           GATGATATGA AAATGTTTTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
M2P                 GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
Tamaulipas_2        GATGATATGA AAATGTTTTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
Nayarit             GATGATATGA AAATGTTTTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
Quintana_Roo        GATGATATGA AACTGTTCTA TGATGTGATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
S2P                 GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAACCAT GTTGAAAAGC
M3P                 GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAACCAT GTTGAAAAGC
M1A                 GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
Pullman             GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
Tabasco             GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
RAD                 GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
T2Bo_BBOV           GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
Xinjiang            GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
Mexico              GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
Veracruz_2          GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGG
T2Bo                GATGATATGA AAATGTTGTA TGATGTAATG CGCAGCATTG ATGAAAGCAT GTTGAAAAGC
L                   GATGATATGA AAATGTTCTA TGATGTGATG CGCAGCATTG ATGAGAGCAT GTTGAAAAGC
F40                 GATGATATGA AAATGTTCTA TGATGTGATG CGCAGCATTG ATGAGAGCAT GTTGAAAAGC
S                   GATGATATGA AAATGTTTTA TGATGTGATG CGCAGCATTG ATGAGAGCAT ATTGAAAAGC
K                   GATGATATGA AACTGTTCTA TGATGTGATG CGCAGCATTG ATGAAAGCGT GTTGAAAAGC
T                   GATGATATGA AACTGTTCTA TGATGTGATG CGCAGCATTG ATGAAAGCGT GTTGAAAAGC
G52                 GATGATATGA AACTGTTCTA TGATGTGATG CGCAGCATTG ATGAAAGCGT GTTGAAAAGC
Clustal Consensus   ********** * **** ** ****** *** *******    ***  * * *  ***** **

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       185        195        205        215        225        235
Amasya              ATTCTTGAGA AGAATCATGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Bartin              ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Bolu                ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Giresun             ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
4107                ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Karabuk-2           ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Kastamonu           ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Samsun-1            ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Samsun-2            ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAATACACAT
Trabzon             ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
R1A                 ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGG ATGGAAGCTC AATCGGCTAC TAAAACACAT
Guerrero            ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAGCACAT
Chiapas_1           ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
M2P                 ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Tamaulipas_2        ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Nayarit             ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Quintana_Roo        ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
S2P                 ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
M3P                 ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
M1A                 ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Pullman             ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Tabasco             ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
RAD                 ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
T2Bo_BBOV           ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Xinjiang            ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Mexico              ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Veracruz_2          ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
T2Bo                ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
L                   ATTCTTGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
F40                 ATTCTTGAGA GGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
S                   ATTCTCGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
K                   ATTCTCGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
T                   ATTCTCGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
G52                 ATTCTCGAGA AGAATTTTGA GGCTGTTGGC ATGGAAGCTA CATCGGCTAC TAAAACACAT
Clustal Consensus   ***** ****  ****  *** *********  *********   *********  ***  *****
```

Şekil 4.18. *Babesia bovis* izolatlarının *msa-2c* gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin kıyaslanması (Devamı)

```
                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       245        255        265        275        285        295
Amasya              GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Bartin              GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Bolu                GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Giresun             GACGCTCTGA AAACTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
4107                GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Karabuk-2           GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Kastamonu           GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Samsun-1            GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Samsun-2            GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Trabzon             GACGCTCTGG AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA TGTATCGGAC
R1A                 GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Guerrero            GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Chiapas_1           GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
M2P                 GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Tamaulipas_2        GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Nayarit             GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Quintana_Roo        GACGCTCTGG AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
S2P                 GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
M3P                 GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCGA CACATCGGAC
M1A                 GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Pullman             GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Tabasco             GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
RAD                 GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
T2Bo_BBOV           GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Xinjiang            GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Mexico              GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
Veracruz_2          GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
T2Bo                GACGCTCTGA AGGCTGTAAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTCAA CACATCGGAC
L                   GACGCTCTCA AGGCTGTGAA ACAATTAATC AAAACCGATG CGCCTTTTAA CACATCCGAC
F40                 GACGCTCTCA AGGCTGTGAA ACAATTAATC AAAACCGATG CGCCTTTTAA CACATCCGAC
S                   GACGCTCTCA AGGCTGTGAA ACAATTAATC AAAACCGATG CGCCTTTTAA CACATCCGAC
K                   GACGCTCTGA AGGCTGTGAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTTAA CACATCTGAC
T                   GACGCTCTGA AGGCTGTGAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTTAA CACATCTGAC
G52                 GACGCTCTGA AGGCTGTGAA ACAATTAATC AAAACCGATG CACCTTTTAA CACATCTGAC
Clustal Consensus   ********   *  **** ** ********** ********** * *****  *     *** ***

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       305        315        325        335        345        355
Amasya              TATGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTT ATGAAGAGCT GTTGAAGCTT
Bartin              TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTC CTGAAGAGCT GCTCAAACTT
Bolu                TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GCTCAAACTT
Giresun             TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATGTA ATGAAGAGCT GCTCAAACTT
4107                TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTC CCGAAGAGCT GCTCAAACTT
Karabuk-2           TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTT ATGAAGAGCT GCTCATACTT
Kastamonu           TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GCTCAAACTT
Samsun-1            TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTC CTGAAGAGCT GCTCAAACTG
Samsun-2            TTTGACACAC TCGATTTGCA ATATCTCTCA GGGCAATTTC ATGAAGAGCT GCTCAAACTG
Trabzon             TTTGACACAC TCGATATGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GCTCAAACTT
R1A                 TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTGAAGCTT
Guerrero            TTTGACACAC TCGATTTGGA CTATCTCTCG GGTCAATCTA ATGAAGAGCT GTTGAAGCTT
Chiapas_1           TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTGAAGCTT
M2P                 TTTGACACAC TCGATTCGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GCTCAAACTT
Tamaulipas_2        TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTGAAGCTT
Nayarit             TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTGAAGCTT
Quintana_Roo        TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GCTCAAACTT
S2P                 TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAGTCTA ATGAAGAGCT GCTCAAACTT
M3P                 TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GCTCAAACTT
M1A                 TTTGACACAC TCGATTCGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GCTCAAACTT
Pullman             TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTGGAGCTT
Tabasco             TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTGAAGCTT
RAD                 TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTGAAGCTT
T2Bo_BBOV           TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTGAAGCTT
Xinjiang            TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTGAAGCTT
Mexico              TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTGAAGCTT
Veracruz_2          TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATTTA ATGAAGAGCT GCTCAAACTT
T2Bo                TTTGACACAC TCGATCTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTGAAGCTT
L                   TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTCAAGCTT
F40                 TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTCAAGCTT
S                   TTTGACACAC TCGATATGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTCAAGCTT
K                   TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTCAAGCTT
T                   TTTGACACAC CCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTCAAGCTT
G52                 TTTGACACAC TCGATTTGGA ATATCTCTCA GGGCAATCTA ATGAAGAGCT GTTCAAGCTT
Clustal Consensus   * ********  ****  * *  ********  ** ** * *    ******** * *    **
```

Şekil 4.18. *Babesia bovis* izolatlarının *msa-2c* gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin kıyaslanması (Devamı)

```
                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       365        375        385        395        405        415
Amasya              CTGATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TACTGTGGGA
Bartin              CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
Bolu                CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
Giresun             CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
4107                CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
Karabuk-2           CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
Kastamonu           CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAGTC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
Samsun-1            CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
Samsun-2            CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA TAACTAACTC TTTTGTGGGA
Trabzon             CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTATGTGGGA
R1A                 CTGATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACCCACTC TTTCGTGGGA
Guerrero            CTGATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACCCACTC TTTCGTGGGA
Chiapas_1           CTGATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
M2P                 CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
Tamaulipas_2        CTGATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
Nayarit             CTGATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
Quintana_Roo        CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
S2P                 CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
M3P                 CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
M1A                 CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
Pullman             CTGATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
Tabasco             CTGATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
RAD                 CTGATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
T2Bo_BBOV           CTGATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
Xinjiang            CTGATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
Mexico              CTGATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
Veracruz_2          CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
T2Bo                CTGATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACTAACTC TTTTGTGGGA
L                   CTCATTGAGG CAGTATATGG TATGGAAATC ATAATTGATA AAACCAACTC TTATGTGGGA
F40                 CTCATTGAGG CAGTATATGG TATGGAAATC ATAATTGAAA AAACCAACTC TTATGTGGGA
S                   CTCATTGAGG CAGTATATGG TATGGAAATC ATAATTGATA AAACCAACTC TTATGTGGGA
K                   CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGATA AAACCAACTC TTATGTGGGA
T                   CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGATA AAACCAACTC TTATGTGGGA
G52                 CTCATTGAGG CAATATATGG TATGGAAATC ATAATTGATA AAACCAACTC TTATGTGGGA
Clustal Consensus   ** ******* ** ******* ******* ** ******** *  ***  **** *   ******

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       425        435        445        455        465        475
Amasya              GAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTACAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
Bartin              GAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
Bolu                GAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
Giresun             AAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
4107                GAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
Karabuk-2           GAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
Kastamonu           GAGAGTGCAG AACATTCTAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
Samsun-1            AAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
Samsun-2            AAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
Trabzon             GAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
R1A                 GAGAGTCAAA AATATTCCGA TGACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAGTATTA CAAGGCTAAT
Guerrero            GAGAGTCAAA AATATTCCGA TGACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAGTATTA CAAGGCTAAT
Chiapas_1           GAGAGTGCAA AACATTCCGA TAAATTGGAC ACCGACTTGA GACAGTACTA CTGGGATAAT
M2P                 GAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
Tamaulipas_2        GAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
Nayarit             GAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
Quintana_Roo        GAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
S2P                 GAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTACAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
M3P                 GAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
M1A                 GAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
Pullman             GGGAGTGCAA AACATTCCGA TAAATTGGAC ACCGACTTGA GACAGTACTA CTGGGATAAT
Tabasco             GAGAGTGCAA AACATTCCGA TAAATTGGAC ACCGACTTGA GACAGTACTA CTGGGATAAT
RAD                 GAGAGTGCAA AACATTCCGA TAAATTGGAC ACCGACTTGA GACAGTACTA CTGGGATAAT
T2Bo_BBOV           GAGAGTGCAA AACATTCCGA TAAATTGGAC ACCGACTTGA GACAGTACTA CTGGGATAAT
Xinjiang            GAGAGTGCAA AACATTCCGA TAAATTGGAC ACCGACTTGA GACAGTACTA CTGGGATAAT
Mexico              GAGGGTGCAA AACATTCCGA TAAATTGGAC ACCGACTTGA GACAGTACTA CTGGGATAAT
Veracruz_2          AAGAGTGCAG AACATTCCAA TAACGTAGAC ACCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
T2Bo                GAGAGTGCAA AACATTCCGA TAAATTGGAC ACCGACTTGA GACAGTACTA CTGGGATAAT
L                   GAGAGTGTAA AGCATTCCAA TAACTTAGAC AGCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
F40                 GAGAGTATAA AGCATTCCGA TAACTTGGAC AGCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
S                   GAGAGTATAA AGCATTCCAA TAACTTAGAC AGCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
K                   GAGAGTGTAA AGCATTCCAA TAACTTAGAC AGCGAGTTGA GAAAATACCA CTGGGATAAT
T                   GAGAGTGTAA AGCATTCCAA TAACTTAGAC AGCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
G52                 GAGAGTGTAA AGCATTCCAA TAACTTAGAC AGCGAGTTGA GAAAATACTA CTGGGATAAT
Clustal Consensus    * **  *  *  ****  * * *  *  ** * *** **** ** * **  * *  ** ****
```

Şekil 4.18. *Babesia bovis* izolatlarının *msa-2c* gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin kıyaslanması (Devamı)

```
                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       485        495        505        515        525        535
Amasya              ATTTACGATG ACCATTGTCA ATATAATAAG GACAACGGAA GCAACCTTTA CAAGGTATTC
Bartin              ATTTACGATG ACCAGAGTGA CTATAATATG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
Bolu                ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
Giresun             ATTTACGATG ACCAGAGTGA CTATATTATG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
4107                ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATATG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
Karabuk-2           ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATATG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
Kastamonu           ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
Samsun-1            ATTTACGATG TCCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
Samsun-2            ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATGATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
Trabzon             ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCACGC
R1A                 ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
Guerrero            ATTTACGATG ACATAAACGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTATA CAAAGCATTT
Chiapas_1           ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
M2P                 ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
Tamaulipas_2        ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
Nayarit             ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
Quintana_Roo        ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
S2P                 ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
M3P                 ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
M1A                 ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
Pullman             ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTATA CAAAGCATTC
Tabasco             ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTATA CAAAGCATTC
RAD                 ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTATA CAAAGCATTC
T2Bo_BBOV           ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTATA CAAAGCATTC
Xinjiang            ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTATA CAAAGCATTC
Mexico              ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTATA CAAAGCATTC
Veracruz_2          ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTTTA CAAGGCATTC
T2Bo                ATTTACGATG ACCAGAGTGA ATATAATAAG GACAAATTAA GCAACCTATA CAAAGCATTC
L                   ATTTACGATG ACCAGAGCGA ATATAATAAA GACAAATTAA TTAACCTTTA CAAGGCATTC
F40                 ATTTACGATG ACCAGAGCGA ATATAATAAA GACAAATTAA TTAACCTTTA CAAGGCATTC
S                   ATTTACGATG ACCAGAGCGA ATATAATAAG GACAAATTAA TTAACCTTTA CAAGGCATTC
K                   ATTTACGATG ACCAGAGCGA ATATAATAAA GACAAATTAA TTAACCTTTA CAAGGCATTC
T                   ATTTACGATG ACCAGAGCGA ATATAATAAA GACAAATTAA TTAACCTTTA CAAGGCATTC
G52                 ATTTACGATG ACCAGAGCGA ATATAATAAA GACAAATTAA TTAACCTTTA CAAGGCATTC
Clustal Consensus   **********  *        *  ***  **   *****   **   ***** ** *** * *

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       545        555        565        575        585        595
Amasya              ATCACTAATT CTGCCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAGCATT CGAAACAAGG
Bartin              ATCACTAATT CTGCTGCTTT GAGAATCGCA TTTAAGGATC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
Bolu                ATCACTAATT CTGCCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
Giresun             ATCACTAATT CTGCCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
4107                ATCACTAATT CTGCTGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
Karabuk-2           ATCACTAATT CTGCTGCATT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
Kastamonu           ATCACTAATT CTGCCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGGAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
Samsun-1            ATCACTAATT CTGCCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
Samsun-2            ATCACTAATT CTGCCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
Trabzon             ATCACTAATT CTGCCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
R1A                 ATCACTGATT CTGGCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTATAAAATT CGAAACAAGG
Guerrero            ATCACTGATT CTGGTGCTTT GGGAATCGCA TTGGAGGAAC TTACAAAATT CGAAACAAGG
Chiapas_1           ATCACTAATT CTGCCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
M2P                 ATCACTAATT CTGCAGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
Tamaulipas_2        ATCACTAATT CTGCCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
Nayarit             ATCACTAATT CTGCCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
Quintana_Roo        ATCACTAATT CTGCCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
S2P                 ATCACTAATT CTGCCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
M3P                 ATCACTAATT CTGCCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
M1A                 ATCACTAATT CTGCAGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
Pullman             ATCACTGATT CTGGCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTATAAAATT CGAAACAAGG
Tabasco             ATCACTGATT CTGGCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTATAAAATT CGAAACAAGG
RAD                 ATCACTGATT CTGGCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTATAAAATT CGAAACAAGG
T2Bo_BBOV           ATCACTGATT CTGGCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTATAAAATT CGAAACAAGG
Xinjiang            ATCACTGATT CTGGCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTATAAAATT CGAAACAAGG
Mexico              ATCACTGATT CTGGCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTATAAAATT CGAAACAAGG
Veracruz_2          ATCACTAATT CTGCCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTAGAAAATT CGAAACAAGG
T2Bo                ATCACTGATT CTGGCGCTTT GAGAATCGCA TCGGAGGAAC TTATAAAATT CGAAACAAGG
L                   ATTACTGATT CTGGTGCTTT GAGAAACGCA GAGGAGGAAC TTACAAAATT CGAAACAAAG
F40                 ATTACTGATT CTGGTGCTTT GAGAAACGCA GAGGAGGAAC TTACAAAATT CGAAACAAAG
S                   ATTACTAATT CTGGTGCTTT GAGAAACGCA TCGGAGGAAC TTACAAAATT CGAAACAAAG
K                   ATTACTGATT CTGGTGCTTT GAGAAACGCA TCGGAGGAAC TTACAAAATT CGAAACAAAG
T                   ATTACTGATT CTGGTGCTTT GAGAAACGCA TCGGAGGAAC TTACAAAATT CGAAACAAAG
G52                 ATTACTGATT CTGGTGCTTT GAGAAACGCA TCGGAGGAAC TTACAAAATT CGAAACAAAG
Clustal Consensus   ** *** *** ***  ** ** * *** ****     ***  * *** *  *** ******** *
```

Şekil 4.18. *Babesia bovis* izolatlarının *msa-2c* gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin kıyaslanması (Devamı)

```
                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       605        615        625        635        645        655
Amasya              AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA ACCCGAAACA
Bartin              AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA ACCCGAAACA
Bolu                AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA ACCCGAAACA
Giresun             AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA ACCCGAAACA
4107                AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA ACCCGAAACA
Karabuk-2           AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATGCTTCTT CAACACCGGA ACCCGAAACA
Kastamonu           AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA ACCCGAAACA
Samsun-1            AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACAGCGGA ACCCGAAACA
Samsun-2            ATAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAAGAGCGGA ACCCGAAACA
Trabzon             AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATGTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA TACCGAAACA
R1A                 AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACTTCGGA AGCCGAAACA
Guerrero            AAATTTCAAA AGGAGGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACTTCGGA ACCCGAATCA
Chiapas_1           AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA AACCGAAACA
M2P                 AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA ACCCGAAACA
Tamaulipas_2        AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA ACCCGAAACA
Nayarit             AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTGTC AATCCTTCTT CAACACCGGA ACCCGAAACA
Quintana_Roo        AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA AACCGAAACA
S2P                 AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA AACCGAAACA
M3P                 AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA AACCGAAACA
M1A                 AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA ACCCGAAACA
Pullman             AAAGCTCAAA AGGATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACTTCGGA AGCCGAAACA
Tabasco             AAAGCTCAAA AGGATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACTTCGGA AGCCGAAACA
RAD                 AAAGCTCAAA AGGATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACTTCGGA AGCCGAAACA
T2Bo_BBOV           AAAGCTCAAA AGGATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACTTCGGA AGCCGAAACA
Xinjiang            AAAGCTCAAA AGGATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACTTCGGA AGCCGAAACA
Mexico              AAAGCTCAAA AGGATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACTTCGGA AGCCGAAACA
Veracruz_2          AAAGCTCAAA AGAATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACACCGGA ACCCGAAACA
T2Bo                AAAGCTCAAA AGGATGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACTTCGGA AGCCGAAACA
L                   AAAGCTCAAA AGGAGGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACTTCGGA ACCCGAATCA
F40                 AAAGCTCAAA AGGAGGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACTTCGGA ACCCGAATCA
S                   AAAGCTCAAA AGGAGGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAACTTCGGA ACCCGAATCA
K                   AAAGCTCAAA AGGAGGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAAATTCGGA ACCCGAATCA
T                   AAAGCTCAAA AGGAGGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAAATTCGGA ACCCGAATCA
G52                 AAAGCTCAAA AGGAGGACTA CAGATTTATC AATCCTTCTT CAAATTCGGA ACCCGAATCA
Clustal Consensus   * *  ***** ** * ***** ***** * ** *** ****** ***   ****   ***** **

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       665        675        685        695        705        715
Amasya              TCCTCTCCAT CGCATGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC TGAGACCCCT
Bartin              TCCTCTCCAT CGCATGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
Bolu                TCCTCTCCAT CGCATGGAGA AAATACTACA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
Giresun             TCCTCTCCAT CGCATGGAGA ATATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCCGC CGAGACCCCT
4107                TCCTCTCCAT CGCATGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
Karabuk-2           TCCTCTCCAT CGCATGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
Kastamonu           TCCTCTCCAT CGCATGGAGA TTATACTACA GCACAACCTC CCAAGCCTGC GGAGACCCCT
Samsun-1            TCCTCTCCAT CGCATGGAGA ATATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
Samsun-2            TCCTCTCCAT CGCATGGAGA ATATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
Trabzon             TCAACTCCAT CGCATGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
R1A                 CCCTCTCCAT CGTCTGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAACCTGC CGAGACCCCT
Guerrero            CCCTCTCCAT CGTCTGGAGA AAATACTGCA GCTCAACCTC CCCAACCTGC CGAGAGTGCT
Chiapas_1           TCCTCTCCAT CGCATGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
M2P                 TCCTCTCCAT CGCATGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
Tamaulipas_2        TCCTCTCCAT CGCATGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
Nayarit             TCCTCTCCAT CGCATGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
Quintana_Roo        TCCTCTCCAT CGCATGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
S2P                 TCCTCTCCAT CGCATGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
M3P                 TCCTCTCCAT CGCATGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
M1A                 TCCTCTCCAT CGCATGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
Pullman             CCCTCTCCAT CGTCTGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAACCTGC CGAGACCCCT
Tabasco             CCCTCTCCAT CGTCTGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAACCTGC CGAGACCCCT
RAD                 CCCTCTCCAT CGTCTGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAACCTGC CGAGACCCCT
T2Bo_BBOV           CCCTCTCCAT CGTCTGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAACCTGC CGAGACCCCT
Xinjiang            CCCTCTCCAT CGTCTGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAACCTGC CGAGACCCCT
Mexico              CCCTCTCCAT CGTCTGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAACCTGC CGAGACCCCT
Veracruz_2          TCCTCTCCAT CGCATGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAGCCTGC CGAGACCCCT
T2Bo                CCCTCTCCAT CGTCTGGAGA AAATACTGCA GCACAACCTC CCAAACCTGC CGAGACCCCT
L                   TCCTCTTCAT CGTCTGGAGA AACTACAGCA GCCCAACCTC CCAAACCTGC TGAGACCCCT
F40                 TCCTCTTCAT CGTCTGGAGA AACTACAGCA GCCCAACCTC CCAAACCTGC TGAGACCCCT
S                   CCCTCTTCAT CGTCTGGAGA AACTACAGCA GCCCAACCTC CCAAACCTGC TGAGACCCCT
K                   CCCTCTCCGT CGTCTGGAGA AACTACTGCA GCACAACCCA GCAAACCTGC CGAGACCCCC
T                   CCCTCTCCGT CGTCTGGAGA AACTACTGCA GCACAACCCA GCAAACCTGC CGAGACCCCT
G52                 CCCTCTCCGT CGTCTGGAGA AACTACTGCA GCACAACCCA GCAAACCTGC CGAGACCCCT
Clustal Consensus    *  ** * * **  ******    ***  ** ** *****    * * ** **  ****   *
```

Şekil 4.18. *Babesia bovis* izolatlarının *msa-2c* gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin kıyaslanması (Devamı)

```
                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       725        735        745        755        765        775
Amasya              AAGCCTACTG GATCTTCATT CACCTATGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
Bartin              AAGCATACTG GATCTTCATT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGGCTACTC TCTGCTACTT
Bolu                AAGCCTACTG GATCTTT-TT CACCTTCGTC CGGTTATACT GTTTTTACTC TCTGCTACTT
Giresun             AAGCCTACTG GATCTTCATT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
4107                AAGCCTACTG GATCTTCATT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGGCTACTC TCTGCTACTT
Karabuk-2           AAGCCTACTG GATCTTCTTT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGTCTACTC TCTGCTACTT
Kastamonu           AAGCCTACTG GATCTTT-TT CACCTTCGTC CGGTTATACT GTTTTTACTC TCTGCTACTT
Samsun-1            AAGCCTACTG GATCTTCATT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
Samsun-2            AAGCCTACTG GATCTTCATT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
Trabzon             AAGCCTACCG GATCTTCTTT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
R1A                 AAGCCTACTG GATCTTTCTT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGGCTACTC TCTGCTACTT
Guerrero            AAGCCTACTG GATCTTCTTT CACCTTTGGC GGATTG-ACC GTGGCCACTC TCTGCTACTT
Chiapas_1           AAGCCTACCG GATCTTCTTT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
M2P                 AAGCCTACCG GATCTTCCTT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGGCTACTC TCTGCTACTT
Tamaulipas_2        AAGCCTACTG GATCTTCATT CACCTATGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
Nayarit             AAGCCTACTG GATCTTCATT CACCTATGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
Quintana_Roo        AAGCCTACCG GATCTTCTTT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
S2P                 AAGCCTACCG GATCTTCCTT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
M3P                 AAGCCTACCG GATCTTCTTT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGGCTACTC TCTGCTACTT
M1A                 AAGCCTACCG GATCTTCCTT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
Pullman             AAGCCTACTG GATCTTCTTT CACCTATGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
Tabasco             AAGCCTACTG GATCTTCTTT CACCTATGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
RAD                 AAGCCTACTG GATCTTCTTT CACCTATGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
T2Bo_BBOV           AAGCCTACTG GATCTTCTTT CACCTATGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
Xinjiang            AAGCCTACTG GATCTTCTTT CACCTATGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
Mexico              AAGCCTACTG GATCTTCTTT CACCTATGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
Veracruz_2          AAGCCTACTG GATCTTCATT CACCTTCGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
T2Bo                AAGCCTACTG GATCTTCTTT CACCTATGGC GGATTG-ACT GTGGCCACTC TCTGCTACTT
L                   AAGCCTACCG GATCTTCATT CACCTTTGGC GGATTG-ACT GTGGCTACTC TCTGCTACTT
F40                 AAGCCTACCG GATCTTCATT CACCTTTGGC GGATTG-ACT GTGGCTACTC TCTGCTACTT
S                   AAGCCTACCG GATCTTCATT CACCTTTGGC GGATTG-ACT GTGGCTACTC TCTGCTACTT
K                   AAGCCTACCG GATCTTCATT CACCTATGGT GGATTG-ACT GTGGCTACTC TCTGCTACTT
T                   AAGCCTACCG GATCTTCATT CACCTATGGT GGGTTG-ACT GTGGCTACTC TCTGCTACTT
G52                 AAGCCTACCG GATCTTCATT CACCTATGGT GGATTG-ACT GTGGCTACTC TCTGCTACTT
Clustal Consensus   **** *** * ******  ** *****  *    * **  **  **    **** **********

                     ....|....| ....|....
                        785        795
Amasya               CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Bartin               CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Bolu                 CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Giresun              CGTTCTCTCT GCATTTTAA
4107                 CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Karabuk-2            CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Kastamonu            CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Samsun-1             CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Samsun-2             CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Trabzon              CGTTCTCTCT GCATTTTAA
R1A                  CGTTCTCTCT GCATTCTAA
Guerrero             CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Chiapas_1            CGTTCTCTCT GCATTTTAA
M2P                  CGTTCTCTCT GCATTT---
Tamaulipas_2         CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Nayarit              CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Quintana_Roo         CGTTCTCTCT GCATTTTAA
S2P                  CGTTCTCTCT GCATTT---
M3P                  CGTTCTCTCT GCATTT---
M1A                  CGTTCTCTCT GCATTT---
Pullman              CGTTCTCTCT GCATTC---
Tabasco              CGTTCTCTCT GCATTTTAA
RAD                  CGTTCTCTCT GCATTTTAA
T2Bo_BBOV            CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Xinjiang             CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Mexico               CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Veracruz_2           CGTTCTCTCT GCATTTTAA
T2Bo                 CGTTCTCTCT GCATTTTAA
L                    CGTTCTCTCT GCATTTTAA
F40                  CGTTCTCTCT GCATTTTAA
S                    CGTTCTCTCT GCATTTTAA
K                    CGTTCTCTCT GCATTTTAA
T                    CGTTCTCTCT GCATTTTAA
G52                  CGTTCTCTCT GCATTTTAA
Clustal Consensus    ********** *****
```

Şekil 4.18. *Babesia bovis* izolatlarının *msa-2c* gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin kıyaslanması (Devamı)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Babesiosis'in teşhisinde eskiden beri mikroskobik muayene ve serolojik teşhis yöntemleri (IFAT, ELISA vb.) kullanılmıştır. Ancak hızla ilerleyen teknolojiyle birlikte son yıllarda nükleik asit tabanlı teşhis yöntemleri (PCR, RLB, Real-Time PCR vb.) babesiosis'in teşhisinde kullanılmaya başlanmıştır. Her tanı yönteminin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (78, 234). *Babesia* türlerinin tespit edilmesinde mikroskobik muayene yetersiz kalabilmektedir. Hastalığı atlatmış hayvanlar vücutlarında çok az da olsa etkeni taşıyabilmektedir. Dolayısıyla bu durumdaki hayvanların kanlarından yapılan frotilerde etkenin saptanması çok zor olabilmektedir. Kanda etken görülse dahi, bunun hangi tür olduğunun tespiti de yanıltıcı durumlar doğurabilir. Ayrıca mikroskobik muayene için deneyimli personele ihtiyaç bulunmaktadır (237, 298). Babesiosis'in teşhisinde sıklıkla kullanılan ve parazite karşı oluşan antikorların tespiti amacıyla kullanılan serolojik yöntemlerin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Sığır kanında etken bulunmasa dahi parazite ait antikorlar varlığını sürdürebilmekte, dolayısıyla teşhiste yanlış veya çapraz pozitifliklere sebep olmaktadır (66, 248).

Son yıllarda mikroskobik ve serolojik teşhis yöntemlerindeki bu sıkıntıları gidermek amacıyla, parazitin DNA'sını veya RNA'sını tespit etmeye yönelik moleküler teşhis yöntemleri geliştirilmiştir. Moleküler teşhis yöntemleriyle birlikte tespit edilen parazit türlerinin çeşitli gen bölgelerine göre moleküler karakterizasyonları yapılmakta ve Dünya'nın çeşitli bölgelerindeki aynı tür parazitlerle akrabalık dereceleri saptanmaktadır (69, 73, 100, 265, 266, 269, 273).

Sığırlarda babesiosis'e yol açan türlerin en önemlilerinden biri olan *B. bovis*, Dünya'da Güney Avrupa, Orta Doğu ve Rusya, Güney Amerika ve Afrika'da yaygın olarak görülmektedir (2, 8, 299).

Türkiye'de *B. bovis*, ilk kez Mimioğlu (33) tarafından Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu vilayetlerinde sığırlarda "*Haemataurai vesicalis bovis*" araştırması ile gündeme gelmiş; Göksu (35) Ankara'da incelediği 996 sığırın 2'sinde (%0,2), takiben aynı araştırıcı (38) bazı Karadeniz illerinde mikroskobik bakısı yapılan 80 sığırın 3'ünde *B. bovis*'i (%3,75) bulmuştur. Göksu (40), Türkiye'nin farklı bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları üzerine yaptığı araştırmasında *B. bovis*'in Marmara ve Güney Doğu Anadolu'da görüldüğünü; Mimioğlu ve ark. (42) *B. bovis* (*Babesia berbera*) Karadeniz Bölgesi'nde daha fazla bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Diğer bir çalışmada ise Karadeniz Bölgesi'nde 76 sığırın 72'sinde *Babesia* sp. saptandığı rapor edilmiştir (47). Öte yandan mikroskobik bakıyla, Elazığ yöresinde iç organlarından froti yapılan 4 sığırın 1'inde (44) ve Ankara'da 185 sığırın 1'inde (%0,54) (56) *B. bovis* saptanmıştır. *Babesia bovis*'in mikroskobik pozitifliği; Marmara bölgesinde %34,8 (43), Malatya ve bazı Güneydoğu Anadolu illerinde %0,5-1,5 arasında (49); Samsun yöresinde %29,53 (50), Kayseri yöresinde %1,04 (51) bulunmuş ve mikroskobik insidensi Ankara'nın Çubuk ilçesinde %9 olarak saptanmıştır (81). Bunun yanında *Babesia* spp. prevalansı, Konya yöresinde %11,46 (52), Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde %0,6-1,4 arasında (53), Adana yöresinde ise %31,8 (54) oranında bildirilmiştir.

Bu çalışmada, sığırlarda *Babesia* türlerinin mikroskobik prevalansı; Amasya'da %4, Artvin'de %8,3, Bolu'da %4,2, Karabük'te %2, Kastamonu'da %5,6 ve Samsun'da %3,8 olarak tespit edilirken; Bartın, Çorum, Giresun, Ordu, Tokat, Trabzon ve Zonguldak'ta mikroskobik bakıda *Babesia* spp. saptanamamıştır. Genel olarak incelendiğinde ise Karadeniz Bölgesi'nde babesiosis'in mikroskobik prevalansı %1,7 olarak bulunmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarla kıyaslandığında babesiosis'in mikroskobik prevalansının Karadeniz Bölgesi'nde daha düşük çıkmasının sebebinin, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı'nın son yıllarda artış göstermesine bağlı olarak Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın son birkaç yıldır hayvanları kenelere karşı yoğun bir şekilde ilaçlama programını uygulamasının olabileceği düşünülmektedir. Bu husus kayıtlarda yer almamakla beraber Veteriner Hekimlerle bizzat yapılan görüşmelerde hemen hepsi bu konuya değinmiş ve ilaçlama programı sonrasında babesiosis ve theileriosis olgularının azaldığını gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Türkiye'de *B. bovis*'in moleküler prevalansı incelendiğinde; PCR ile sığırlarda babesiosis'in teşhisinin ilk defa Tanyüksel ve ark. (68) tarafından yapıldığı görülmektedir. *Babesia bovis*'in

moleküler prevalansı konusunda Türkiye'de sınırlı sayıda çalışma olup; PCR ile Ankara yöresinde %12,68, Burdur yöresinde %8 ve Samsun yöresinde %3,85 (68); RLB ile Ankara yöresinde %2,3 (62) ve %3,6 (61), Trakya Bölgesi'nde %1,3 (83) *B. bovis* tespit edilmiştir. Ayrıca Kayseri yöresinde sığırlardan toplanan keneler üzerinde yapılan moleküler çalışmalar sonucu *Babesia* sp. saptanmış ve bu suş *Babesia* sp. (*Kayseri 1*) olarak GenBanka kayıt ettirilmiştir (70).

Karadeniz Bölgesi'nde RLB ile yapılan bu çalışmada *B. bovis*'in moleküler prevalansı; Amasya'da %4; Bartın'da %2,3, Bolu'da %4,2, Giresun'da %1,6, Karabük'te %1,4, Kastamonu'da %5,6, Samsun'da %3,8 ve Trabzon'da %2,2 olarak belirlenmiştir. Artvin, Çorum, Ordu, Tokat ve Zonguldak'tan temin edilen kan örneklerinde ise etken saptanamamıştır. Genel olarak Karadeniz Bölgesi'nde *B. bovis*'in moleküler prevalansı %1,8 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları daha önce Samsun yöresinde PCR ile yapılan moleküler çalışma (68) sonuçlarını doğrulamıştır.

Bu çalışmanın epidemiyolojik verilerinin istatistiksel analizleri değerlendirildiğinde; sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin yayılışı ile yaş arasında istatistiksel bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$). Bu durum, 2 yaşa gelene kadar sığırların meraya çıktıklarını veya bir şekilde vektör kenelerle enfeste olduklarını göstermektedir. Piroplasm enfeksiyonlarının cinsiyete bağlı değişimi incelendiğinde; *T. buffeli/orientalis* ve toplam piroplasm enfeksiyonunun dişilerde erkeklere oranla daha yaygın olduğu görülmüş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer türlerin dağılımı ile cinsiyet arasında ise istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). *Theileria buffeli/orientalis* ve toplam piroplasm enfeksiyonunun dişilerde erkeklere oranla daha yaygın bulunmasının, araştırma yörelerinde dişilerin daha sık olarak meraya çıkarılması, erkeklerin ise genellikle 2 yaşa ulaşmadan kasaplık yapılması ve çoğu kere de meraya çıkarılmayıp ahırda beslenmeleri ve dolayısıyla dişi hayvanların kene enfestasyonlarına daha sık maruz kalmaları ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. *Babesia* ve *Theileria* türlerinin yayılışının ırka bağlı değişimi incelendiğinde; *B. bovis*, *B. bigemina*, *T. annulata* ve *T. buffeli/oreintalis* türlerine göre istatistiksel bir farklılık belirlenmemesine ($p>0,05$) karşın, toplam piroplasm enfeksiyonları yerli ırklarda daha yaygın saptanmış ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Ortaya çıkan bu sonuç, her ne kadar klinik

belirtilerle seyretmese de yerli ırkların piroplasm enfeksiyonlarında kültür ırkı sığırlara göre daha fazla portör görevi üstlendiğini göstermektedir.

Günümüzde sığırlarda *Babesia* türlerinin moleküler karakterizasyon çalışmaları, Türkiye'de (62, 69, 70, 73) ve Dünya'da (66, 256, 258-265, 300-303) genellikle *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitler için ortak bir bölge olan 18S rRNA geninin değişken V4 gen bölgesi üzerinde yapılmaktadır.

Son yıllarda babeisosis'e karşı kullanılan attenüe canlı aşıların yerine subunit aşıların geliştirilmesi konusunda çalışmalar hız kazanmıştır. Bu noktada özellikle parazitlerin eritrositlere invazyonunun engellenmesi ve böylece patogeneze esas teşkil eden intraeritrositik aseksüel çoğalma fazının durdurulması hedeflenmiştir. Söz konusu çalışmalarda, subunit aşılarda kullanılacak olan aşı adayı antijenleri kodlayan gen bölgelerinin araştırılması, bu bölgelerin değişken ve konservatif özelliklerinin saptanması ve bu özelliklerin dünyanın farklı bölgelerindeki suşlarda farklılıklar gösterip göstermediğinin araştırılması konuları öne çıkmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda parazitin eritrositlere invazyonunda Variable Merozoit Surface Antijenleri (VMSA)'nin önemli olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'de ise babesiosis'e karşı aşılama yapılmamaktadır. Ayrıca sığırlarda yaygın olarak görülen *B. bovis*'in *msa-1*, *msa2a*$_1$, *msa2a*$_2$, *msa-2b* ve *msa-2c* gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonu ile ilgili olarak Türkiye'de bugüne kadar hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bu gen bölgeleri ile ilgili çalışmalar Dünya'da da kısıtlı sayıdadır (100, 107, 145, 147, 266, 267, 269-271, 273, 275-277, 304).

Babesia bovis'e özgü bu merozoit yüzey antijenleri arasında *msa-2c* geni, diğer gen bölgelerine göre *B. bovis* suşları arasında daha yüksek oranda korunmuşluğunu muhafaza etmiştir. Dolayısıyla farklı coğrafik bölgelerdeki *B. bovis* izolatları arasında bu gen bölgesinin antijenik benzerliği daha yüksektir. Ayrıca yapısında, yüksek oranda nötralizasyon-duyarlı antikorların ortaya çıkmasını sağlayan B hücre epitoplarını içermektedir. Bu özelliğinden dolayı aşı çalışmalarında diğer yüzey antijenlerine göre daha etkin olduğu tespit edilmiştir (266).

msa-2c gen bölgesi ile yapılan bir çalışmada (266) bu gen bölgesinin yüksek oranda immunojenik olduğu, sığırlarda B hücre epitoplarını yüksek oranda muhafaza ettiği saptanmıştır. Hem heterelog R1A ve S2P suşları arasında hem de farklı ülkelerden elde edilen Avustralya

orijinli S izolatı ile Amerika orijinli R1A suşları arasında yüksek oranda B hücre epitopları bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca doğal yolla veya deneysel olarak *B. bovis*'in Arjantin kaynaklı R1A suşu ile enfekte sığırların kanlarından elde edilen serumun, immunoblot çalışmalarında diğer saha suşlarının *msa-2c* proteinini spesifik olarak tanıdığını saptamışlardır. Bunun sebebinin *B. bovis*'in saha suşları arasında *msa-2c* gen bölgesinin çok yüksek oranda B hücre epitoplarını ihtiva etmesinden kaynaklandığını rapor etmişlerdir. Wilkowsky ve ark. (266) tarafından yapılan bu çalışmada *msa-2c* gen bölgesinin farklı coğrafik bölgelerdeki *B. bovis* suşları arasında antijenik yapısının yüksek oranda benzerlik gösterdiği ve dolayısıyla bu gen bölgesinin aşı çalışmalarında çok önemli role sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Diğer yandan Berens ve ark. (277), *B. bovis*'e ait *msa-2* proteinleri üzerine yaptıkları bir çalışmada Avustralya orjinli 12 izolat ile Amerika orjinli 3 izolatın antijenik farklılıklarını kıyaslamıştır. *msa-2* protein ailesindeki *msa-2a* ve *msa-2b* genlerini *msa-2a/b* olarak bir arada değerlendirmişlerdir. *msa-2a/b* genlerinin farklı izolatlar arasındaki identikliklerinin çok değişken olduğunu ve *msa-2c* geninin ise farklı bölgelere ait izolatlar arasında dahi %92-100 oranında identik olduğunu belirlemişlerdir. Dolayısıyla *msa-2c* geninin, *msa2a/b* genlerine oranla çok daha iyi bir aşı adayı olduğunu göstermişlerdir.

Benzer bir çalışmada Dominguez ve ark. (275), nötralizasyona duyarlı B hücre epitoplarını içeren *msa-2* proteinlerinden *msa-2a*$_1$, *msa-2b* ve *msa-2c* genlerinin amino asit sekanslarını karşılaştırmışlardır. Arjantin kaynaklı R1A suşu ile Arjantin, Amerika Birleşik Devletleri ve Meksika'dan elde edilen izolatların *msa-2a*$_1$, *msa-2b* ve *msa-2c* gen bölgeleri arasında kıyaslama yapmışlardır. Buna göre; *msa-2a*$_1$ gen bölgesi ile yapılan karşılaştırmada izolatların protein sekansları arasında %68-92, *msa-2b* ile %70-84 ve *msa-2c* ile %86-94 oranında identiklik tespit etmişlerdir. Bunun yanında nötralizasyona duyarlı olan B hücrelerinin de en yüksek oranda *msa-2c* proteinlerinde bulunduğunu bildirmişlerdir. Farklı izolatlar arasındaki en tutarlı identikliğin de *msa-2c* gen bölgesinde saptandığını rapor etmişlerdir.

Florin-Christensen ve ark. (100) Arjantin R1A ve Meksika Mo7 suşlarını; *msa-2a*$_1$, *msa-2a*$_2$, *msa-2b* ve *msa-2c* gen bölgelerinin amino asit sekans dizilimlerine göre kıyaslamış ve bu iki suş arasında gen bölgelerine göre sırasıyla %83,6, %69,4, %79,1 ve %88,7 oranında identiklik tespit etmişlerdir. Bu gen bölgelerinden *msa-2a*$_1$, *msa-2b* ve *msa-2c*'de B hücre epitoplarının varlığını gösterirken, *msa-2a*$_2$'de bu hücre epitoplarına rastlayamamışlardır.

Borgonio ve ark. (269) Meksika, Arjantin ve Avustralya suşlarını *msa-1* ve *msa-2c* gen bölgeleri açısından moleküler olarak karşılaştırmışlar ve *msa-1* geni ile yapılan kıyaslamada Meksika suşlarının kendi aralarında %51-99,7 identiklik gösterdiğini; Meksika suşlarının Arjantin suşları ile %22-51 oranında; Avustralya suşları ile ise %23-81 oranında identik olduğunu saptamışlardır. Diğer yandan aynı araştırıcılar *msa-2c* geni ile yaptıkları kıyaslamada ise Meksika suşlarının kendi aralarında %90-100 identik olduğunu; Arjantin ve Avustralya izolatları ile ise %88-95 oranında benzerlik gösterdiğini tespit etmişler ve *msa-2c* geninin en ideal aşı adayı olduğunu göstermişlerdir.

Öte yandan benzer şekilde Genis ve ark. (270) farklı bölgelerden elde edilen *B. bovis* Meksika izolatlarının; *msa-1*, *msa-2b*, *msa-2c* ve *ssrRNA* gen bölgelerine göre benzerliklerini karşılaştırmışlar ve izolatlar arasındaki benzerlik oranlarını gen bölgelerine göre sırasıyla %47,7, %72,3, %87,7 ve %94 olarak belirlemişlerdir. *ssrRNA* gen bölgesinin izolatlar arasında, yüzey antijenlerine göre daha yüksek oranda antijenik benzerlik gösterdiğini, yüzey antijenleri arasında ise *msa-2c* geninin identiklik oranının diğerlerine göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

Bu çalışmada da konservatif karakterli *B. bovis msa-2c* gen bölgesinin Türkiye'nin Karadeniz Bölgesi'nden izole edilen *B. bovis* izolatlarında moleküler karakteri net olarak ortaya konmuş ve Dünya'daki diğer benzer izolatlarla karşılaştırılması yapılmıştır. İzolatlar arasındaki moleküler benzerlikleri en yüksekten en düşüğe doğru sıralanmıştır.

Buna göre Amasya izolatının, Tamaulipas-2 ve Nayarit izolatlarıyla %97; Veracruz 2, Karabuk (4107), S2P, M1A ve M2P izolatlarıyla %96; Quintana Roo, Samsun-1, M3P, Karabuk-2, Bartin, Samsun-2, Chiapas 1, Giresun ve Bolu izolatlarıyla %95; T2Bo BBOV_I003020, Tabasco, Xinjiang, Mexico, T2Bo, Kastamonu, Pullman ve Trabzon izolatlarıyla %94; RAD izolatıyla %93; R1A izolatıyla %92, Guerrero izolatıyla %90; S, F40, T, K, G52 ve L izolatlarıyla %89 oranında identik olduğu saptanmıştır.

Aynı şekilde Bartin izolatının, Veracruz 2, Karabuk (4107), M1A, Samsun-1 ve M2P izolatlarıyla %98; Karabuk-2, M3P, Giresun, S2P, Quintana Roo, Tamaulipas-2, Nayarit, Samsun-2 ve Bolu izolatlarıyla %97; Kastamonu izolatıyla %96; Trabzon, Chiapas 1, Amasya, Tabasco ve T2Bo BBOV_I003020 izolatlarıyla %95; Xinjiang, Mexico, T2Bo ve Pullman izolatlarıyla %94; RAD

ve R1A izolatlarıyla %93; Guerrero izolatıyla %91; S, F40, T, K, G52 ve L izolatlarıyla %90 oranında identiklik gösterdiği belirlenmiştir.

Bolu izolatının, Kastamonu izolatıyla %99; M2P, M3P, Veracruz 2, Karabuk-2, Samsun-1, Karabuk (4107), M1A, Quintana Roo, S2P, Tamaulipas-2, Nayarit ve Bartin izolatlarıyla %97; Giresun, Samsun-2 ve Chiapas 1 izolatlarıyla %96; Trabzon, Amasya, T2Bo BBOV_I003020 ve Tabasco izolatlarıyla %95; Xinjiang, Mexico, T2Bo, Pullman ve RAD izolatlarıyla %94; R1A izolatıyla %93; Guerrero izolatıyla %91; S, F40, T, K, G52 ve L izolatlarıyla %90 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir.

Benzer şekilde Giresun izolatının, Veracruz 2 ve Samsun-1 izolatlarıyla %98; Karabuk (4107), M1A, Bartin, M2P, M3P, Samsun-2, S2P, Quintana Roo, Tamaulipas-2, Karabuk-2 ve Nayarit izolatlarıyla %97; Bolu ve Kastamonu izolatıyla %96; Trabzon, Chiapas 1 ve Amasya izolatlarıyla %95; T2Bo BBOV_I003020, Tabasco, Xinjiang, Mexico, T2Bo ve Pullman izolatlarıyla %94; RAD ve R1A izolatlarıyla %93; Guerrero, S, L ve G52 izolatlarıyla %90; F40, T ve K izolatlarıyla %89 oranında identiklik gösterdiği saptanmıştır.

Karabuk (4107) izolatı ise Bartin, M2P, Veracruz 2, Samsun-1, Karabuk-2, M1A, M3P, Quintana Roo, S2P, Tamaulipas-2 ve Nayarit izolatlarıyla %98; Giresun, Samsun-2, Bolu ve Kastamonu izolatlarıyla %97; Trabzon, Chiapas 1 ve Amasya izolatlarıyla %96; T2Bo BBOV_I003020, Tabasco, Xinjiang, Mexico, T2Bo ve Pullman izolatlarıyla %95; RAD ve R1A izolatlarıyla %94; Guerrero, S, F40, T, K, G52 ve L izolatlarıyla %91 benzer bulunmuştur.

Aynı şekilde Karabuk-2 izolatının, Karabuk (4107), M2P, M1A, M3P ve Veracruz 2 izolatlarıyla %98; Bartin, Quintana Roo, S2P, Samsun-1, Bolu, Tamaulipas-2, Nayarit, Giresun ve Kastamonu izolatlarıyla %97; Samsun-2, Trabzon ve Chiapas 1 izolatlarıyla %96; Amasya, T2Bo BBOV_I003020, Tabasco, Xinjiang, Mexico, T2Bo ve Pullman izolatlarıyla %95; RAD izolatıyla %94; R1A izolatıyla %93; Guerrero, S ve L izolatlarıyla %91; G52, F40, T ve K izolatlarıyla %90 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir.

Yine Kastamonu izolatının, Bolu izolatıyla %99; M2P, M1A, M3P, Veracruz 2, Karabuk-2 ve Karabuk (4107) izolatlarıyla %97; Quintana Roo, Samsun-1, S2P, Tamaulipas-2, Nayarit, Bartin, Giresun ve Samsun-2 izolatlarıyla %96; Chiapas 1 ve Trabzon izolatlarıyla %95; Amasya, T2Bo BBOV_I003020, Tabasco, Xinjiang, Mexico ve T2Bo izolatlarıyla %94; Pullman, RAD ve R1A

izolatlarıyla %93; Guerrero izolatıyla %90; S, F40, T, K, G52 ve L izolatlarıyla %89 oranında identiklik gösterdiği saptanmıştır.

Bir diğer izolat olan Samsun-1 izolatının da Veracruz 2 izolatıyla %99; Samsun-2, Karabuk (4107), M2P, M1A, M3P, Bartin, Giresun, S2P ve Quintana Roo izolatlarıyla %98; Tamaulipas-2, Nayarit, Karabuk-2 ve Bolu izolatlarıyla %97; Kastamonu, Trabzon ve Chiapas 1 izolatlarıyla %96; Amasya, T2Bo BBOV_I003020, Tabasco, Xinjiang, Mexico, T2Bo ve Pullman izolatlarıyla %95; RAD izolatıyla %94; R1A izolatıyla %93; Guerrero izolatıyla %91; S, F40, T, K, G52 ve L izolatlarıyla %90 benzer olduğu gösterilmiştir.

Benzer olarak Samsun-2 izolatının, Veracruz 2 ve Samsun-1 izolatlarıyla %98; Karabuk (4107), M2P, M1A, M3P, Bartin, Giresun, S2P, Quintana Roo, Tamaulipas-2 ve Nayarit izolatlarıyla %97; Karabuk-2, Bolu ve Kastamonu izolatlarıyla %96; Amasya, Trabzon ve Chiapas 1 izolatlarıyla %95; T2Bo BBOV_I003020, Tabasco, Xinjiang, Mexico, T2Bo ve Pullman izolatlarıyla %94; RAD ve R1A izolatlarıyla %93; Guerrero, S, G52 ve L izolatlarıyla %90; F40, T ve K izolatlarıyla %89 identik olduğu bulunmuştur.

Son olarak Trabzon izolatının ise Quintana Roo izolatıyla %98; M3P, M1A ve S2P izolatlarıyla %97; M2P, Veracruz 2, Karabuk (4107), Tamaulipas-2, Samsun-1, Nayarit ve Karabuk-2 izolatlarıyla %96; Bartin, Giresun, Samsun-2, Bolu, Chiapas 1 ve Kastamonu izolatlarıyla %95; Amasya, T2Bo BBOV_I003020, Tabasco, Xinjiang, Mexico ve T2Bo izolatlarıyla %94; Pullman ve RAD izolatlarıyla %93; R1A izolatıyla %92; S, G52, L, F40, T ve K izolatlarıyla %90 ve Guerrero izolatıyla %89 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma ile, Türkiye'de ilk defa *B. bovis*'in *msa-2c gen* bölgesinin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Karadeniz Bölgesi'nden elde edilen DNA'larda moleküler yöntemlerle *B. bovis* suşları tespit edilmiş ve bu izolatların *msa-2c* gen bölgesine spesifik primerlerle PCR'ları yapılmıştır. PCR sonucu *msa-2c* gen bölgesine spesifik DNA bantları jelden ekstrakte edilerek sekans analizleri yapılmıştır. Sekans sonuçları GenBank'a kaydettirilmiştir. GenBank'a kayıtları yapılan bu suşların kendi aralarındaki ve Dünya'da yapılmış diğer çalışmalardan elde edilen izolatlarla identiklik oranları tespit edilmiştir. Sekans dizilimlerindeki benzerlikleri incelenen bütün suşların filogenetik akrabalıkları filogenetik ağaç oluşturularak gösterilmiştir. Elde edilen izolatlar ile Dünya'daki benzer diğer izolatların nükleotit

dizilimlerindeki benzerlik ve farklılıklar da clustal consensus ile incelenmiştir. Bu sonuçlara göre Türkiye'de Karadeniz Bölgesi'nden izole edilen *B. bovis* suşlarının hem kendi aralarındaki hem de Dünya'dan bildirilen ve yukarıda isimleri verilen *B. bovis* izolatları ile olan yüksek benzerlikleri daha önce bildirilen literatür bilgilerle (100, 266, 269, 270, 275, 277) uyumlu bulunmuştur. İzolatlar arasındaki bu yüksek benzerliklerin, *msa-2c* gen bölgesinin korunmuş bir bölge olduğunu göstermenin yanında geçmişteki tarihi süreçte hayvan hareketleriyle de ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın, gelecekte Türkiye'ye özgü suşlarla yapılacak aşı çalışmalarına temel teşkil edeceği düşünülmektedir. Türkiye'de babesiosis'e karşı henüz aşılama yapılmamaktadır. Bununla birlikte bu çalışmadan sağlanan bilimsel alt yapı ile gelecekte yapılacak aşı çalışmaları için önemli bir aşama kaydedilmiştir. Sonuç olarak, Türkiye'ye özgü suşlarla yapılacak aşılar, hastalığa karşı korunmada etkin rol oynayacak ve hastalığa bağlı ekonomik kayıpların azalmasına yardımcı olacaktır. Bu çalışmada kullanılan yöntemler ve elde edilen sonuçlar söz konusu parazitlere ait bilgi birikimi oluşturmanın yanında, model bir araştırma olarak daha sonra yapılacak çalışmalara temel oluşturacak ve araştırıcılara farklı perspektifler sunacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. McCosker JP. The global importance of babesiosis. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 1-24.
2. Kuttler KL, Clıfford DJ, Touray BN. Prevalance of anaplasmosis and babesiosis in N'Dama cattle of the Gambia. Trop Anim Hlth Prod 1988; 20(1): 37-41.
3. Angus B. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. Int J Parasitol 1996; 26: 1341-1355.
4. Uilenberg G. *Babesia* – A historical overview. Vet Parasitol 2006; 138: 3-10.
5. İnci A. Orta Anadolu Bölgesinde Sığır Babesiosisi, XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kayseri ve Ürgüp 18-23 Kasım 2007, ss 77-78.
6. Systema Naturae 2000, The Taxonomicon, Universal Taxonomic Services, Amsterdam. Erişim: [http://sn2000.taxonomy.nl/], Erişim Tarihi: 08.01.2010
7. Oosthuizen MC, Zweygarth E, Collins NE, et al. Identification of a novel *Babesia* sp. from a sable antelope (Hippotragus niger Harris, 1838). J Clin Microbiol 2008; 46(7): 2247-2251.
8. Purnell RE. Babesiosis in various hosts. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 25-64.
9. Allsopp MT, Cavalier-Smith T, De Waal DT, Allsopp BA. Phylogeny and evolution of the piroplasms. Parasitology 1994; 108: 147-152.
10. Allsopp MT, Allsopp BA. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. Ann N Y Acad Sci 2006; 1081: 509-517.
11. Rudzinska MA. Host-cell-parasite relationships. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 88-135.

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

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

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

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

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

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

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

19. Bock R, Jackson L, de Vos A, et al. Babesiosis of cattle. Parasitology 2004; 129: 247-269.

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

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

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

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

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

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

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

27. Levine ND. Veterinary Protozoology. Iowa State University Press Ames, 1th Edition 1985; pp 291-312.

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

29. Ekrem İ. Piroplasmoslar hakkında en yeni malumat. Türk Baytarlar Mecmuası 1931; 6: 65-73.

30. Lestoquard M. Piroplasmoslar. Baytari Mecmua 1931; 9: 8-9.

31. Gören S, Yetkin R. Tek tırnaklılarda, sığırda, koyunda, keçide ve köpekte piroplazmoz. Milli Müd Baytar Bakt Serum ve Aşı Evi Yay 1935.

32. Aysoy S. Piroplasmos (Piroplasmose). Tıbbi Klinik Kılavuzu, Talebe Ders Kılavuzu, Sayı 24, Yüksek Ziraat Enstitüsü Matbaası, Ankara 1941.

33. Mimioğlu M. Samsun, Ordu, Giresun ve Bolu Vilayetlerinde "Haematurai vesicalis bovis"li sığırlarda parasitolojik araştırmalar, Ankara Üniv Vet Fak Derg 1955, 11: 183-192.

34. Kurtpınar H. Erzurum, Kars, Ağrı vilayetlerinde sığır, koyun ve keçilerin yaz aylarına mahsus parazitleri ve bunların doğurduğu hastalıklar. Türk Vet Hek Dern Derg 1956; 26: 3226-3232.

35. Göksu K. Ankara ve civarı sığırlarında theileriosis üzerinde sistematik araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1959; 115: 60.

36. Özcan CH. Ankara ve civarında evcil hayvanlarda görülen Piroplasmose vakaları ve tedavileri üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Basımevi 1961; ss 10-106.

37. Erkut HM. Ege bölgesindeki sığırlarda piroplasmosis durumu ve tedavide yeni ilaçlamalar. Bornova Vet Araş Enst Derg 1967; 8: 120-130.

38. Göksu K. Batı Karadeniz bölgesi illerinin sığırlarında gözlenen *Babesidae* (Sporozoa: Piroplasmida) enfeksiyonları. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1968; 15: 46-57.

39. Göksu K. Doğu Anadolu Bölgesinde hayvanlarda görülen başlıca paraziter hastalıklar ve bunlarla savaşta göz önüne alınacak hususlar. Türk Vet Hek Dern Derg 1969; 39 (4): 13-22.

40. Göksu K. Yurdumuzun çeşitli bölgelerinde sığırlarda Piroplasmida enfeksiyonları (piroplasmossis, babesiosis, theileriosis ve anaplasmosis'in yayılış durumları). Türk Vet Hek Dern Derg 1970; 40 (4): 29-39.

41. Hoffman G, Hörchner F, Scheın E, et al. Saisonales auftreten von zecken und piroplasmen bei haustieren in des asiatischen provinzen der Turkei. Berl Münch Tierarztl Wschr 1971; 84: 152-156.

42. Mimioğlu M, Güler S, Ulutaş M. Untersuchungen über die Blutparasiten bie rindem in der Türkei. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1972; 2: 183-192.

43. Tüzer E. İstanbul ili ve çevresinde sığırlarda görülen *Babesia*, *Theileria* ve *Anaplasma* türleri ve bunlardan oluşan enfeksiyonların yayılışı üzerinde araştırma. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 1981; 8 (1): 97-110.

44. Dumanlı N, Özer E. Elazığ yöresinde sığırlarda görülen kan parazitleri ve yayılışları üzerinde araştırmalar. Selçuk Üniv Vet Fak Derg 1987; 3(1): 159-166.

45. Sayın F, Friedhoff KT, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A. Beytepe köyünde sığır babesiosisi üzerinde seroepidemiyolojik araştırmalar. 6. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ No:104, İstanbul 1989.

46. Taşçı S. Van bölgesinde sığır ve koyunlarda görülen kene türleri ile bunların taşıdığı kan parazitleri arasındaki ilişkiler. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1989; 36(1): 53-63.

47. Dinçer Ş, Sayın F, Karaer Z, ve ark. Karadeniz bölgesi sığırlarında, bulunan kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1991; 38 (1-2): 206-226.

48. İnci A. Ankara'nın Çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine araştırmalar, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 1991.

49. Özer E, Erdoğmuş SZ, Köroğlu E, ve ark. Malatya ve Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kan parazitleri ve yayılışları. Turk J Vet Am Sci 1993; 17 (3): 209-215.

50. Açıcı M. Samsun ve yöresi sığırlarında kan parazitlerinin yayılışı. Etlik Vet Mik Derg 1995; 8 (1-2): 271-277.

51. İnci A, Çakmak A, Karaer Z, ve ark. Kayseri yöresinde sığırlarda babesiosisin seroprevalansı. Turk J Vet Anim Sci 2002; 26: 1345-1350.

52. Sevinc F, Sevinc M, Birdane MF, et al. Prevalence of *Babesia bigemina* in cattle. Revue de Méd Vét 2001; 152(5): 395-398.

53. Aktaş M, Dumanlı N, Karaer Z, ve ark. Elazığ, Malatya, ve Tunceli illerinde sığırlarda *Babesia* türlerinin seroprevalansı. Turk J Vet Anim Sci 2001; 25 (4): 447-451.

54. Nalbantoğlu S, Vatansever Z, Karaer Z, Cakmak A. The epidemiology of cattle babesiosis in Adana region. Babesia World Summit, December 1-3, Buenos Aires, Argentina 2005.

55. Sevinç F, Özdemir Ö, Coşkun A. Onbir günlük bir buzağıda akut Babesiosis. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2005; 2: 131-135.

56. Çakmak A. Untersuchungen zur inzidenz von haemoparasiten in der provinz Ankara. Tierarztl Hochsch Diss Hannover 1987.

57. Sayın F, Friedhoff KT, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H. Ankara yöresi sığırlarında kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. 6. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ Özetleri. Tebliğ No:103, İstanbul 1989.

58. Eren H. Ankara yöresinde sığır babesiosisinin sero-prevalansı. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1993; 40 (1): 23-37.

59. Sayın F, Dinçer Ş, Karaer Z, Çakmak A, İnci A, Yukarı BA, Eren H, Friedhoff KT, Müler I. Studies on seroprevalence of *Babesia* infection of cattle in Turkey. In: Özcel MA (ed), New dimensions in parasitology, 1996; 20(1):505-516.

60. Vatansever, Z., Nalbantoğlu, S., Çakmak, A. Çukurova bölgesinde sığır babesiosis'nin epidemiyolojisi. 12. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Elazığ 2001.

61. Vatansever Z, İça A, Deniz A, Nalbantoğlu S, Karaer Z, Çakmak A, Sparagano O. Ankara yöresinde sığırlarda kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının yayılışının reverse line blotting (RLB)ve indirek floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ Özetleri. 194, Konya 2003.

62. İça A. Sığırlarda bazı *Babesia* türlerinin indirek floresan antikor ve reverse line blotting yöntemi ile karşılaştırmalı tanısı. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2004; 1(2): 77-85.

63. Kaya G, Cakmak A, Karaer Z. Seroprevalance of theileriosis and babesiosis of cattle. Medycyna Wet 2006; 62 (2): 156-158.

64. Çakmak A, Öz İ. Adana yöresi sığırlarında kan protozoonlarının serodiagnozu. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1993;40 (1): 70-77.

65. Rijpkema SG, Molkonboer MJ, Schouls LM, et al. Simultaneous detection and genotyping of

three genomic groups of *Borrelia burdgoferi* Sensulato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterisation of the amplifıed intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. J Clin Microbiol 1995; 33: 3091-3095.

66. Gubbels MJ, De Vos S, Van Der Weide M, Viseras J, Schouls LM, De Vries E, Jongejan F. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species using reverse line blotting hybridization. J. Clin. Microbiol 1999; 37: 1782-1789.

67. Schnittger L, Yin H, Qi B, et al. Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. Parasitol Res 2004; 92: 189-196.

68. Tanyüksel M, Vatansever Z, Karaer Z, ve ark. Sığır babesiosisinin epidemiyolojisi ve zoonotik önemi. T Parazitol Derg 2002; 26 (1): 42-47.

69. İça A, İnci A, Yıldırım A. Parasitological and molecular prevalence of bovine *Theileria* and *Babesia* species in the vicinity of Kayseri. Turk J Vet Anim Sci 2007; 31: 33-38.

70. İca A, Vatansever Z, Yildirim A, et al. Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. Vet Parasitol 2007; 148(2): 156-160.

71. İnci A, İça A, Florin-Christensen M, Vatansever Z, Yıldırım A, Düzlü Ö, Mosqueda J, Yavuz A. Türkiye'nin çeşitli yörelerinden elde edilen *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın moleküler karakterizasyonu. XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kayseri ve Ürgüp, 18-23 Kasım 2007, ss 163-164.

72. İça A, İnci A, Yıldırım A, Düzlü Ö, Aktaş M, Bişkin Z. Türkiye'de sığırlarda *Babesia* ve *Theileria* türlerinin moleküler prevalansı. XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Adana, 1-7 Kasım 2009, s 215.

73. Altay K, Aydin MF, Dumanli N, et al. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. Vet Parasitol 2008; 158: 295-301.

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

75. Jack RM, Ward PA. Organ and vascular pathology of babesiosis. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 459-470.

76. Wright IG, Goodger BV. Pathogenesis of Babesiosis. In: Ristic M (ed), Babesiosis of Domestic Animals and Man. Boca Raton, Florida, CRC Press 1988; pp 99-118.

77. Sonenshine DE. Biology of Ticks. Newyork, Oxford, Oxford University Press Vol. II, Chapter V 1993.

78. Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, et al. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. Clin Microbiol Rev 2003; 16(4): 622-636.

79. Clark IA, Jacobson LS. Do babesiosis and malaria share a common disease process? Ann Trop Med Parasitol 2005; 92 (4): 483-488.

80. Zintl A, Gray JS, Skerrett HE, et al. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. Parasite Immunol 2005; 27 (4): 115-120.

81. İnci A. Ankara'nın Çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1992; 39(1-2): 153-167.

82. Düzgün A, Alabay M, Çerçi H, ve ark. A serological study for babesiosis in cattle in Turkey using the ELISA test. IAEA-TECDOC-657 1991; pp 175-177.

83. Bilgin Z. Trakya'da sığırlarda bulunan Theileria ve Babesia türlerinin ve bunların sığırlarda yaygınlığının reverse line blooting (RLB) tekniği ile araştırılması, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2007.

84. Gün H, Tanyüksel M, Yukarı BA, ve ark. Türkiye'de babesiosisin ilk insan serodiyagnozu. T Parazitol Derg 1996; 20 (1): 1-7.

85. Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford III SR, et al. Babesiosis. Clin Microbiol Rev 2000; 13(3): 451-469.

86. Mimioğlu M, Ulutaş M, Güler S. Yurdumuz sığırlarında theileriosis etkenleri ve diğer kan parazitleri. Ajans-Türk Matbaacılık Sanayi, Ankara 1971.

87. Minami T, Ishira T. *Babesia ovate* sp. n. isolated from cattle in Japan. Nat Inst of Anim Hlth Quarterly 1980; 20: 101-113.

88. Beyer TV, Svezhova NV, Radchenko AI, et al. Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem). Cell Biol Int 2002; 26 (10): 861-871.

89. Striepen B, Jordan CN, Reiff S, et al. Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa. PLoS Pathog 2007; 3 (6): 78.

90. Haldar K, Mohandas N, Samuel BU, et al. Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. Cell Microbiol 2002; 4 (7): 383-395.

91. Baunaure F, Langsley G. Protein traffic in *Plasmodium* infected-red blood cells. Med Sci 2005; 21(5): 523-529.

92. Brayton KA, Lau AO, Herndon DR, et al. Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. PLoS Pathog 2007; 3 (10): 1401-1413.

93. Langsley G, van Noort V, Carret C, et al. Comparative genomics of the Rab protein family in Apicomplexan parasites. Microbes Infect 2008; 10 (5): 462-470.

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

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

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

97. Yamasaki M, Asano H, Otsuka Y, et al. Use of canine red blood cell with high concentrations of potassium, reduced glutathione, and free amino acid as host cells for in vitro cultivation of *Babesia gibsoni*. Am J Vet Res 2000; 61 (12):1520-1524.

98. Murase T, Iwai M, Maede Y. *Direct evidence for preferential multiplication of Babesia gibsoni* in young erythrocytes. Parasitol Res 1993; 79 (4): 269-271.

99. Yamasaki M, Yamato O, Hossain MA, et al. *Babesia gibsoni*: preferential multiplication in reticulocytes is related to the presence of mitochondria and a high concentration of adenosine 5'-triphosphate in the cells. Exp Parasitol 2002; 102 (3-4): 164-169.

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

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

102. Suarez CE, McElwain TF, Stephens EB, et al. Sequence conservation among merozoite apical complex proteins of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and other apicomplexa. Mol Biochem Parasitol 1991; 49 (2): 329-332.

103. Sam-Yellowe TY. Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. Parasitol Today 1996; 12: 308-316.

104. Howell SA,Well I, Fleck SL, et al. A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. J Biol Chem 2003; 278: 23890-23898.

105. Matuschewski K, Nunes AC, Nussenzweig V, et al. *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. EMBO J 2002; 21: 1597-1606.

106. Jasmer DP, Reduker DW, Hines SA, et al. Surface epitope localization and gene structure of a *Babesia bovis* 44-kilodalton variable merozoite surface antigen. Mol Biochem Parasitol 1992; 55: 75-83.

107. Hines SA, Palmer GH, Jasmer DP, et al. Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. Infec Immun 1995; 63: 349-352.

108. Ruef BJ, Dowling SC, Conley PG, et al. A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane. Mol Biochem Parasitol 2000; 105: 1-12.

109. Heintzelman MB, Schwartzman JD. Myosin diversity in apicomplexa. J Parasitol 2001; 87: 429-432.

110. Hettmann C, Herm A, Geiter A, et al. A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. Mol Biol Cell 2000; 11: 1385-1400.

111. Pinder JC, Fowler RE, Bannister LH, et al. Motile systems in malaria merozoites: how is the red blood cell invaded? Parasitol Today 2000; 16: 240-245.

112. Margos G, Siden-Kiamos I, Fowler RE, et al. Myosin A expressions in sporogonic stages of *Plasmodium*. Mol Biochem Parasitol 2000; 111: 465-469.

113. Matuschewski K, Mota MM, Pinder JC, et al. Identification of the class XIV myosins Pb-MyoA and Py-MyoA and expression in *Plasmodium* sporozoites. Mol Biochem Parasitol 2001; 112: 157-161.

114. Lew AE, Dluzewski AR, Johnson AM, et al. Myosins of *Babesia bovis*: molecular characterisation, erythrocyte invasion, and phylogeny. Cell Motil Cytoskel 2002; 52 (4): 202-220.

115. Varki A. N-Glycolylneuraminic acid deficiency in humans. Biochimie 2001; 83: 615-622.

116. Zintl A, Westbrook C, Skerrett HE, et al. Chymotrypsin and neuraminidase treatment inhibits host cell invasion by *Babesia divergens* (phylum Apicomplexa). Parasitology 2002; 125: 45-50.

117. Gaffar FR, Franssen FF, de Vries E. *Babesia bovis* merozoites invade human, ovine, equine, porcine, and caprine erythrocytes by a sialic acid-dependent mechanism followed by developmental arrest after a single round of cell fission. Int J Parasitol 2003; 33: 1595-1603.

118. Bork S, Yokoyama N, Ikehara Y, et al. Growth-inhibitory effect of heparin on *Babesia* parasites. Antimicrob Agents Ch 2004; 48(1): 236-241.

119. Tizard IR. Veterinary immunolgy: An Introduction. 8th Edition, Saunders 2009; pp 312-329.

120. Hileman RE, Fromm JR, Weiler JM, et al. Glycosaminoglycan–protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. Bioessays 1998; 20: 156-167.

121. Mulloy B, Forster MJ. Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. Glycobiology 2000; 10: 1147-1156.

122. Karin M. Signal transduction and gene control. Curr Opin Cell Biol 1991; 3: 467-473.

123. Bray D. Intracellular signaling as a paralel distributed process. J Theor Biol 1990; 143: 215-231.

124. Russello SV, Shore SK. SRC in human carcinogenesis. Front Biosci 2004; 9: 139-144.

125. Bork S, Das S, Okubo K, et al. Effects of protein kinase inhibitors on the in vitro growth of *Babesia bovis*. Parasitology 2006; 132: 775-779.

126. Nakamura K, Yokoyama N, Igarashi I. Cyclin-dependent kinase inhibitors block erythrocyte invasion and intraerythrocytic development of *Babesia bovis* in vitro. Parasitology 2007; 134: 1347-1353.

127. Allred DR. Antigenic variation in babesiosis: is there more than one ‘‘why’’? Microbes Infect 2001; 3: 481-491.

128. Allred DR, Al-Khedery B. Antigenic variation as an exploitable weakness of babesial parasites. Vet Parasitol 2006; 138(1-2): 50-60.

129. Wilkowsky SE, Moretta R, Mosqueda J, et al. A new set of molecular markers fort he genotyping of *Babesia bovis* isolates. Vet Parasitol 2009; 161(1-2): 9-18.

130. Phillips RS. Antigenic variation in *Babesia rodhaini* demonstrated by immunization with irradiated parasites. Parasitology 1971; 63: 315-322.

131. Roberts JA, Tracey-Patte P. *Babesia rodhaini*: immunoinduction of antigenic variation. Int J Parasitol 1975; 5: 573-576.

132. Homer MJ, Bruinsma ES, Lodes MJ, et al. A polymorphic multigene family encoding an immunodominant protein from *Babesia microti*. J Clin Microbiol 2000; 38: 362-368.

133. Thompson KC, Todorovic RA, Hidalgo RJ. Antigenic variation of *Babesia bigemina*. Res Vet Sci 1977; 23: 51-54.

134. Allred DR, Cinque RM, Lane TJ, et al. Antigenic variation of parasite-derived antigens on the surface of Babesia bovis-infected erythrocytes. Infect Immun 1994; 62: 91-98.

135. O'Connor RM, Lane TJ, Stroup SE, et al. Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA1) expressed by *Babesia bovis* during antigenic variation. Mol Biochem Parasitol 1997; 89: 259-270.

136. Cowman AF, Bernard O, Stewart N, et al. Genes of the protozoan parasite *Babesia bovis* that rearrange to produce RNA species with different sequences. Cell 1984; 37 (2): 653-660.

137. Hines SA, Palmer GH, Jasmer DP, et al. Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of Babesia bovis encoded by members of a polymorphic gene family. Mol Biochem Parasitol 1992; 55: 85-94.

138. Palmer GH, McElwain TF, Perryman LE, et al. Strain variation of *Babesia bovis* merozoite surface-exposed epitopes. Infect Immun 1991; 59 (9): 3340-3342.

139. Suarez CE, Palmer GH, Hötzel I, et al. Sequence and functional analysis of the intergenic regions separating babesial rhoptry-associated protein-1 (rap-1) genes. Exp Parasitol 1998; 90 (2): 189-194.

140. Mishra VS, McElwain TF, Dame JB, et al. Isolation, sequence and differential expression of the p58 gene family of *Babesia bigemina*. Mol Biochem Parasitol 1992; 53 (1-2): 149-158.

141. Dalrymple BP, Casu RE, Peters JM, et al. Characterisation of a family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis*. Mol Biochem Parasitol 1993; 57 (2):181-192.

142. Hötzel I, Suarez CE, McElwain TF, et al. Genetic variation in the dimorphic regions of RAP-1 genes and rap-1 loci of *Babesia bigemina*. Mol Biochem Parasitol 1997; 90 (2): 479-489.

143. Suarez CE, Palmer GH, Florin-Christensen M, et al. Organization, transcription, and expression of rhoptry associated protein genes in the *Babesia bigemina* rap-1 locus. Mol Biochem Parasitol 2003; 127 (2): 101-112.

144. İnci A, İça A, Albasan H. *Babesia* Enfeksiyonlarında İmmunite. In: Özcel MA, İnci A, Turgay N, Köroğlu E (eds), Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. İzmir, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları 2007, No:21, ss 508-515.

145. Mosqueda J, McElwain TF, Palmer GH. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. Infect Immun 2002; 70 (11): 6448-6455.

146. James MA. Application of exoantigens of *Babesia* and *Plasmodium* in vaccine development. Trans R Soc Trop Med Hyg 1989; 83: 67-72.

147. Suarez CE, Florin-Christensen M, Hines SA, et al. Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 (MSA-1) locus and identification of a cross-reactive inhibition-sensitive MSA-1 epitope. Infect Immun 2000; 68 (12): 6865-6870.

148. Carcy B, Précigout E, Schetters T, et al. Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity.Vet Parasitol 2006;138 (1-2): 33-49.

149. Fukumoto S, Tamaki Y, Shirafuji H, et al. Immunization with recombinant surface antigen P50 of *Babesia gibsoni* expressed in insect cells induced parasite growth inhibition in dogs. Clin Diagn Lab Immunol 2005;12 (4): 557-559.

150. Terkawi MA, Jia H, Zhou J, et al. *Babesia gibsoni* ribosomal phosphoprotein P0 induces cross-protective immunity against *B. microti* infection in mice. Vaccine 2007; 25 (11): 2027-2035.

151. De la Fuente J, Kocan KM. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. Parasite Immunol 2006; 28 (7): 275-283.

152. De Vos AJ, Bock RE. Vaccination against bovine babesiosis. Ann N Y Acad Sci 2000; 916: 540-545.

153. Edelhofer R, Müller A, Schuh M, et al. Differentiation of *Babesia bigemina, B. bovis, B. divergens* and *B. major* by western blotting--first report of *B. bovis* in Austrian cattle. Parasitol Res 2004; 92 (5): 433-435.

154. Shkap V, Leibovitz B, Krigel Y, et al. Vaccination of older Bos taurus bulls against bovine babesiosis. Vet Parasitol 2005; 129 (3-4): 235-242.

155. De Waal DT, Combrink MP. Live vaccines against bovine babesiosis.Vet Parasitol 2006; 138 (1-2): 88-96.

156. Zwart D, Brocklesby DW. Babesiosis: non-specific resistance, immunological factors and pathogenesis. Adv Parasitol 1979; 17: 49-113.

157. Levy MG, Clabaugh G, Ristic M. Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. Infect Immun 1982; 37 (3): 1127-1131.

158. Goff WL, Johnson WC, Parish SM, et al. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. Parasite Immunol 2001; 23 (9): 463-471.

159. Joyner LP, Donnelly J, Payne R, et al. The indirect fluorescent antibody test for the differentiation of infections with *Babesia divergens* or *Babesia major*. Res Vet Sci 1972; 13 (6): 515-518.

160. Christensson DA. Inverse age resistance to experimental *Babesia divergens* infection in cattle. Acta Vet Scand 1989; 30 (4): 453-464.

161. Johnson WC, Cluff CW, Goff WL, et al. Reactive oxygen and nitrogen intermediates and products from polyamine degradation are Babesiacidal in vitro. Ann N Y Acad Sci 1996; 791: 136-147.

162. Goff WL, Johnson WC, Horn RH, et al. The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type-1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. Parasite Immunol 2003; 25 (4): 185-188.

163. Goff WL, Storset AK, Johnson WC, et al. Bovine splenic NK cells synthesize IFN-gamma in response to IL-12-containing supernatants from *Babesia bovis*-exposed monocyte cultures. Parasite Immunol 2006; 28 (5): 221-228.

164. Stich RW, Shoda LK, Dreewes M, et al. Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. Infect Immun 1998; 66 (9): 4130-4136.

165. Shoda LK, Palmer GH, Florin-Christensen J, et al. *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1beta, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. Infect Immun 2000; 68 (9): 5139-5145.

166. Brown GK, Canfield PJ, Dunstan RH, et al. Detection of *Anaplasma* platys and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. Aust Vet J 2006; 84 (9): 321-325.

167. Brown WC, Estes DM, Chantler SE, et al. DNA and a CpG oligonucleotide derived from Babesia bovis are mitogenic for bovine B cells. Infect Immun 1998; 66 (11): 5423-5432.

168. Werling D, Hope JC, Howard CJ, et al. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. Immunology 2004; 111 (1): 41-52.

169. McGuire TC, Musoke AJ, Kurtii T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils, and skin. Immunology 1979; 38: 249-256.

170. Dalgliesh RJ. Babesiosis. In: Warren KS (ed), Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections. Oxford, Blackwell 1993, pp 352-383.

171. Estes DM, Closser NM , Allen GK. IFN-γ stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti-μ and mitogen. Cell Immunol 1994; 154: 287-295.

172. Echaide IE, Hines SA, McElwain TF, et al. In vivo binding of immunoglobulin M to the surfaces of *Babesia bigemina*-infected erythrocytes. Infect Immun 1998; 66: 2922-2927.

173. Parrodi F, Jacobson RH, Wright IG, et al.. The effect of immune serum and complement on the in vitro phagocytosis of *Babesia rodhaini*. Parasite Immunol 1991; 13: 457-471.

174. Meeusen E, Lloyd S, Soulsby EJ. *Babesia microti* in mice: adoptive transfer of immunity with serum and cells. Aust J Exp Biol Med Sci 1984; 62: 551-566.

175. Ruebush MJ, Hanson WL. Transfer of immunity to *Babesia microti* of human origin using T lymphocytes in mice. Cell Immunol 1980; 52: 255-265.

176. Clark IA, Allison AC. *Babesia microti* and *Plasmodium berghei* yoelii infections in nude mice. Nature 1974; 252: 328-329.

177. Zivkovic D, Speksnijder JE, Kuil H, et al. Immunity to *Babesia* in mice. III. The effects of corticosteroids and anti-thymocyte serum on mice immune to *Babesia rodhaini*. Vet Immunol 1985; 9: 131-142.

178. Matsubara J, Koura M, Kamiyama T. Infection of immunodeficient mice with a mouse-adapted substrain of the gray strain of *Babesia microti*. J Parasitol 1993; 79: 783-786.

179. Ruebush MJ, Troutman EH, Kennedy DA. Delayed-type hypersensitivity to *Babesia microti*-infected erythrocytes in mice. Cell Immunol 1986; 98: 289-299.

180. Igarashi I, Waki S, Ito M, et al. Role of $CD4^+$ T cells in the control of primary infection with *Babesia microti* in mice. J Protozool Res 1994; 4: 164-171.

181. Shimada T, Shikano S, Hashiguchi R, et al. Effects of depletion of T cell subpopulations on the course of infection and anti-parasite delayed type hypersensitivity response in mice infected with *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*. J Vet Med Sci 1996; 58: 343-347.

182. Quick RE, Herwaldt BL, Thomford JW. Babesiosis in Washington State: a new species of *Babesia*? Ann Int Med 1993; 119: 284-290.

183. Hemmer RM, Ferrick DA, Conrad PA. Role of T cells and cytokines in fatal and resolving experimental babesiosis: protection in TNFR p55 -/- mice infected with the human *Babesia* WA1 parasite. J Parasitol 2000; 86: 736-742.

184. Aguilar-Delfin I, Homer MJ, Wettstein PJ, et al. Innate resistance to *Babesia* infection is influenced by genetic background and gender. Infect Immun 2001; 69: 7955-7958.

185. Zivkovic D, Seinen W, Kuil H, et al. Immunity to *Babesia i*n mice. I. adoptive transfer of immunity to *Babesia rodhaini* with immune spleen cells and the effect of irradiation on the protection of immune mice. Vet Immunol 1984; 5: 343-357.

186. Eugui EM, Allison AC. Differences in susceptibility of various mouse strains to haemoprotozoan infections: possible correlation with natural killer activity. Parasitol Immunol 1980; 2: 277-292.

187. Saeki H, Ishii T. Effect of silica treatment on resistance to *Babesia rodhaini* infection in immunized mice. Vet Parasitol 1996; 61: 201-210.

188. Rosenblatt-Bin H, Klein A, Sredni B. Antibabesial effect of the immunomodulator AS101 in mice: role of increased production of nitric oxide. Parasite Immunol 1996; 18: 297-306.

189. Clark IA. Does endotoxin cause both the disease and parasite death in acute malaria and babesiosis? Lancet 1978; 75-77.

190. Shoda LKM, Kegerreis KA, Suarez CE, et al. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor-alpha, and nitric oxide. Infect Immun 2001; 69: 2162-2171.

191. Yarovinski F, Zhang D, Andersen JF. TLR11 activation of dendritic cells by a protozooan profilin-like protein. Science 2005; 308: 1626-1629.

192. Zhang D, Zhang G, Hayden MS. A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. Science 2004, 303: 1522-1526.

193. Lauw FN, Caffrey DR , Golenbock DT. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. Trends Immunol 2005; 26: 509-511.

194. Blaxter M. Parasite genomics. In: Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki RW (eds), Molecular Medical Parasitology. Academic Press, London, UK 2003; pp 3-29.

195. Ray BK, Bailey CW, Jensen JB, et al. Chromosomes of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Mol Biochem Parasitol 1992; 52: 123-126.

196. Bowman S, Lawson D, Basham D, et al. The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*. Nature 1999; 400: 532-538.

197. Gardner MJ, Bishop R, Shah T, et al. Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. Science 2005; 309: 134-137.

198. Pain A, Renauld H, Berriman M, et al. Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva*. Science 2005; 309: 131-133.

199. Bishop R, Shah T, Pelle R, et al. Analysis of the transcriptome of the protozoan *Theileria parva* using MPSS reveals that the majority of genes are transcriptionally active in the schizont stage. Nucleic Acids Res 2005; 33: 5503-5511.

200. Ren Q, Kang KH, Paulsen IT. TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. Nucleic Acids Res 2004; 32: 284-288.

201. Fichera ME, Roos DS. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. Nature 1997; 390: 407-409.

202. Williamson DH, Gardner MJ, Preiser P, et al. The evolutionary origin of the 35 kb circular DNA of *Plasmodium falciparum*: new evidence supports a possible rhodophyte ancestry. Mol Gen Genet 1994; 243: 249-252.

203. Kohler S, Delwiche CF, Denny PW, et al. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. Science 1997; 275: 1485-1489.

204. Cai X, Fuller AL, McDougald LR, et al. Apicoplast genome of the coccidian *Eimeria tenella*. Gene 2003; 321: 39-46.

205. Kairo A, Fairlamb AH, Gobright E, et al. A 7.1 kb linear DNA molecule of *Theileria parva* has scrambled rDNA sequences and open reading frames for mitochondrially encoded proteins. EMBO J 1994; 13: 898-905.

206. Fisher TG, McElwain TF, Palmer GH. Molecular basis for variable expression of merozoite surface antigen gp45 among American isolates of *Babesia bigemina*. Infect Immun 2001; 69 (6): 3782-3790.

207. Delbecq S, Precigout E, Vallet A, et al. *Babesia divergens*: cloning and biochemical characterization of Bd37. Parasitology 2002; 125: 305-312.

208. Günzl A. Transcription. In: Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki RW (eds), Molecular Medical Parasitology. Academic Press, London, UK 2003, pp 47-67.

209. Suarez CE, Norimine J, Lacy P, et al. Characterization and gene expression of *Babesia bovis* elongation factor-1alpha. Int J Parasitol 2006; 36 (8): 965-973.

210. Suarez CE, Palmer GH, LeRoith T, et al. Intergenic regions in the rhoptry associated protein-1 (rap-1) locus promote exogenous gene expression in *Babesia bovis*. Int J Parasitol 2004; 34 (10):1177-1184.

211. Yee J, Tang A, Lau WL, et al. Core histone genes of *Giardia intestinalis*: genomic organization, promoter structure, and expression. BMC Mol Biol 2007; 10 (8): 26.

212. Upston JM, Gero AM. Increased glucose permeability in *Babesia bovis*-infected erythrocytes. Int J Parasitol 1990; 20 (1): 69-76.

213. Alkhalil A, Hill DA, Desai SA. *Babesia* and plasmodia increase host erythrocyte permeability through distinct mechanisms. Cell Microbiol 2007; 9(4): 851-860.

214. Derbyshire ET, Franssen FJ, de Vries E, et al. Identification, expression and characterisation of a *Babesia bovis* hexose transporter. Mol Biochem Parasitol 2008; 161 (2): 124-129.

215. Seeber F, Limenitakis J, Soldati-Favre D. Apicomplexan mitochondrial metabolism: a story of gains, losses and retentions. Trends Parasitol 2008; 24 (10): 468-478.

216. Ohmori T, Adachi K, Fukuda Y, et al. Glucose uptake activity in murine red blood cells infected with *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*. J Vet Med Sci 2004; 66 (8): 945-949.

217. Barry DN. Metabolism of *Babesia* parasites in vitro. Change in adenylate energy charge and infectivity of *Babesia rodhaini*-infected erythrocytes. Aust J Exp Biol Med Sci 1984; 62: 63-71.

218. Cazzulo JJ. Amino acid and protein metabolism. In: Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki RW (eds), Molecular Medical Parasitology. Academic Press, London, UK 2003; pp 171-197.

219. De Vries E, Corton C, Harris B, et al. Expressed sequence tag (EST) analysis of the erythrocytic stages of *Babesia bovis*.Vet Parasitol 2006; 138 (1-2): 61-74.

220. Fleige T, Fischer K, Ferguson DJ, et al. Carbohydrate metabolism in the Toxoplasma gondii apicoplast: localization of three glycolytic isoenzymes, the single pyruvate dehydrogenase complex, and a plastid phosphate translocator. Eukaryot Cell 2007; 6 (6): 984-996.

221. McFadden GI. Plastids, mitocondria, and hydrogenosomes. In: Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki RW (eds), Molecular Medical Parasitology. Academic Press, London, UK 2003; pp 3-29.

222. Shikano S, Katoh R, Adachi K, et al. Mitochondrial function in *Babesia microti* and *Babesia rodhaini.* Int J Parasitol 1998; 28 (4): 567-570.

223. Rodriguez SD, Buening GM, Vega CA, et al. Enzymatic characterization of *Babesia bovis*. J Protozool 1986; 33 (4): 507-511.

224. Yamasaki M, Hossain MA, Jeong JR, et al. *Babesia gibsoni*-specific isoenzymes related to energy metabolism of the parasite in infected erythrocytes. J Parasitol 2003; 89 (6):1142-1146.

225. Nelson DL, Cox MM. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. In: Nelson DL, Cox MM (eds), Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Edition, WH Freeman and Company, New York 2004; pp 691-750.

226. Goodman CD, McFadden GI. Fatty acid synthesis in protozoan parasites: unusual pathways and novel drug targets. Curr Pharm Des 2008; 14 (9): 901-916.

227. Matias C, Nott SE, Bagnara AS, et al. Purine salvage and metabolism in *Babesia bovis*. Parasitol Res 1990; 76 (3): 207-213.

228. Gero AM, O'Sullivan WJ, Wright IG, et al. The enzymes of pyrimidine biosynthesis in *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Aust J Exp Biol Med Sci 1983; 61: 239-243.

229. Holland JW, Gero AM, O'Sullivan WJ. Enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis in *Babesia rodhaini*. J Protozool 1983; 30 (1): 36-40.

230. Florin-Christensen J, Suarez CE, Florin-Christensen M, et al. Phosphatidylcholine formation is the predominant lipid biosynthetic event in the hemoparasite *Babesia bovis*. Mol Biochem Parasitol 2000; 106 (1):147-156.

231. Vial HJ, Eldin P, Tielens AG, et al. Phospholipids in parasitic protozoa. Mol Biochem Parasitol 2003; 126 (2):143-154.

232. Crawford MJ, Fraunholaz MJ, Roos DS. Energy Metabolism in the Apicomplexa. In: Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki RW (eds), Molecular Medical Parasitology. Academic Press, London, UK 2003; pp 154-171.

233. Häselbarth K, Tenter AM, Brade V, et al. First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. Int J Med Microbiol 2007; 297 (3): 197-204.

234. Skotarczak B. Babesiosis of human and domestic dog; ethiology, pathogenesis, diagnostics. Wiad Parazytol 2007; 53 (4): 271-280.

235. Kim C, Alhassan A, Verdida RA, et al. Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis.Vet Parasitol 2007; 148 (2): 137-143.

236. Böse R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, De Vos AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. Vet. Parasitol 1995; 57: 61-74.

237. Rosenblatt JE. Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites. Clin Infect Dis 2009; 49(7):1103-1108.

238. Todorovic RA, Carson CA. Methods for measuring the immunological response to *Babesia*. In: Ristic M, Kreier JP (eds), Babesiosis. New York, Academic Press 1981; pp 381-409.

239. Bakheit MA, Seitzer U, Mbati PA, et al. Serological diagnostic tools for the major tick-borne protozoan diseases of livestock. Parassitologia 2007; 49 Suppl 1: 53-62.

240. Rehbein G, Heidrich-Joswig S. Use of schizont and piroplasm antigens of *Babesia equi* in the indirect fluorescent antibody and complement fixation tests. Vet Parasitol 1983; 12(2):135-144.

241. Weiland G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Vet Parasitol 1986; 20(1-3):43-48.

242. Singh H, Mishra AK, Rao JR, et al. Comparison of indirect fluorescent antibody test (IFAT) and slide enzyme linked immunosorbent assay (SELISA) for diagnosis of *Babesia bigemina* infection in bovines. Trop Anim Health Prod 2009; 41(2):153-9.

243. Urdaz-Rodríguez JH, Fosgate GT, Waghela SD, et al. Seroprevalence estimation and management factors associated with high herd seropositivity for *Babesia bovis* in commercial dairy farms of Puerto Rico. Trop Anim Health Prod 2009; 41(7):1465-1473.

244. Cantu CA, Ortega-S JA, García-Vázquez Z, et al. Epizootiology of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in free-ranging white-tailed deer in northeastern Mexico. J Parasitol 2009; 95(3):536-542.

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

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

247. Altangerel K, Alhassan A, Iseki H, et al. Evaluation of *Babesia bigemina* 200 kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. Parasitol Res 2009;105(1):249-254.

248. Criado-Fornelio A. A review of nucleic-acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasms. Parassitologia 2007; 49 Suppl 1:39-44.

249. Lau AO, Tibbals DL, McElwain TF. *Babesia bovis*: the development of an expression oligonucleotide microarray. Exp Parasitol 2007; 117(1):93-98.

250. Liu Q, Zhou YQ, Zhou DN, et al. Semi-nested PCR detection of *Babesia orientalis* in its natural hosts *Rhipicephalus haemaphysaloides* and buffalo. Vet Parasitol 2007; 143(3-4): 260-266.

251. Iseki H, Alhassan A, Ohta N, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. J Microbiol Methods 2007; 71(3):281-287.

252. Kledmanee K, Suwanpakdee S, Krajangwong S, et al. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon canis* in canine blood. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2009; 40(1):35-39.

253. Kim C, Iseki H, Herbas MS, et al. Development of TaqMan-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Am J Trop Med Hyg 2007; 77(5):837-841.

254. Ica A, Vatansever Z, Yildirim A, et al. Investigation of ovine blood protozoa by reverse line blotting in the Kayseri region. 2. Babesia World Summit, Palermo, Italy, Parassitologia 2007a; 49 (1): 90.

255. Altay K, Aktas M, Dumanli N, et al.. Evaluation of a PCR and comparison with RLB for detection and differentiation of *Theileria* sp. MK and other *Theileria* and *Babesia* species of small ruminants. Parasitol Res 2008; 103: 319-323.

256. Laughery JM, Lau AO, White SN, et al. *Babesia bovis*: transcriptional analysis of rRNA gene unit expression. Exp Parasitol 2009; 123(1):45-50.

257. Suarez CE, McElwain TF. Stable expression of a GFP-BSD fusion protein in *Babesia bovis* merozoites. Int J Parasitol 2009; 39(3): 289-297.

258. Sparagano O, Loria GR, Gubbels MJ, et al. Integrated molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species of cattle in Italy. Ann N Y Acad Sci 2000; 916: 533-539.

259. Georges K, Loria GR, Riili S, et al. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. Vet. Parasitol 2001; 99: 273-286.

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

261. Almeria S, Castella J, Ferrer D, et al. Reverse line blot hybridization used to identify hemoprotozoa in Minorcan cattle. Ann N Y Acad Sci 2002; 969: 78-82.

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

263. Luo J, Yin H, Liu Z, et al. Molecular phylogenetic studies on an unnamed bovine *Babesia* sp. based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. Vet Parasitol 2005; 133(1):1-6.

264. Liu Q, Zhao JL, Zhou YQ, et al. Study on some molecular characterization of *Babesia orientalis*.Vet Parasitol 2005; 130(3-4):191-198.

265. Martins TM, Neves L, Pedro OC, et al. Molecular detection of *Babesia* spp. and other haemoparasitic infections of cattle in Maputo Province, Mozambique. Parasitology 2010; 4:1-8.

266. Wilkowsky SE, Farber M, Echaide I, et al. *Babesia bovis* merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. Mol Biochem Parasitol 2003; 127(2):133-141.

267. Wilkowsky SE, Farber M, Gil G, et al. Molecular characterization of *Babesia bovis* strains using PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the msa2-a/b genes. Ann N Y Acad Sci 2008; 1149:141-144.

268. Zupańska AK, Drummond PB, Swetnam DM, et al. Universal primers suitable to assess population dynamics reveal apparent mutually exclusive transcription of the *Babesia bovis* ves1alpha gene. Mol Biochem Parasitol 2009; 166(1):47-53.

269. Borgonio V, Mosqueda J, Genis AD, et al. *msa-1* and *msa-2c* gene analysis and common epitopes assessment in Mexican *Babesia bovis* isolates. Ann N Y Acad Sci 2008; 1149:145-148.

270. Genis AD, Mosqueda JJ, Borgonio VM, et al. Phylogenetic analysis of Mexican *Babesia bovis* isolates using msa and ssrRNA gene sequences. Ann N Y Acad Sci 2008;1149: 121-125.

271. Genis AD, Perez J, Mosqueda JJ, et al. Using msa-2b as a molecular marker for genotyping Mexican isolates of *Babesia bovis*. Infect Genet Evol 2009; 9(6):1102-1107.

272. Brown WC, Norimine J, Goff WL, et al. Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. Parasite Immunol 2006; 28(7): 315-327.

273. Mosqueda J, McElwain TF, Stiller D, et al. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes.Infect Immun 2002; 70(3):1599-1603.

274. Suarez CE, McElwain TF. Transfection systems for *Babesia bovis*: a review of methods for the transient and stable expression of exogenous genes. Vet Parasitol 2010; 167(2-4): 205-215.

275. Dominguez M, Echaide I, Echaide ST, et al. In silico predicted conserved B-cell epitopes in the merozoite surface antigen-2 family of *B. bovis* are neutralization sensitive. Vet Parasitol 2010; 167(2-4):216-226.

276. Leroith T, Brayton KA, Molloy JB, et al. Sequence variation and immunologic cross-reactivity among *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 proteins from vaccine strains and vaccine breakthrough isolates. Infect Immun 2005; 73(9):5388-5394.

277. Berens SJ, Brayton KA, Molloy JB, et al. Merozoite surface antigen 2 proteins of *Babesia bovis* vaccine breakthrough isolates contain a unique hypervariable region composed of degenerate repeats. Infect Immun 2005; 73(11):7180-7189.

278. Bono MF, Mangold AJ, Baravalle ME, et al. Efficiency of a recombinant MSA-2c-based ELISA to establish the persistence of antibodies in cattle vaccinated with *Babesia bovis*. Vet Parasitol 2008; 157(3-4):203-210.

279. Kuttler KL, Gipson CA, Goff WL, et al. Experimental *Babesia equi* infection in mature horses. Am J Vet Res 1986; 47 (8): 1668-1670.

280. Rashid HB, Chaudhry M, Rashid H, et al. Comparative efficacy of diminazene diaceturate and diminazene aceturate for the treatment of babesiosis in horses. Trop Anim Health Prod 2008; 40(6):463-467.

281. Aryeetey R, Jimenez-Lucho V. Babesiosis. Curr Treat Options Infect Dis 2002; 4: 319-326.

282. Sakuma M, Setoguchi A, Endo Y. Possible emergence of drug-resistant variants of *Babesia gibsoni* in clinical cases treated with atovaquone and azithromycin. J Vet Intern Med 2009; 23(3): 493-498.

283. Aboulaila M, Nakamura K, Govind Y, et al. Evaluation of the in vitro growth-inhibitory effect of epoxomicin on *Babesia* parasites. Vet Parasitol 2010; 167(1): 19-27.

284. Wijaya A, Wulansari R, Ano H, et al. Effect of clindamycin therapy on phagocytic and oxidative activity profiles of spleen mononuclear cells in *Babesia rodhaini*-infected mice. J Vet Med Sci/Jpn Soc Vet Sci 2001; 63: 563-566.

285. Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB. The treatment of babesiosis. N Engl J Med 2001; 344: 773.

286. Rodríguez M, Penichet ML, Mouris AE, et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with recombinant Bm86 antigen preparation. Vet Parasitol 1995; 57: 339-349.

287. Pipano E, Alekceev E, Galker F, et al. Immunity against *Boophilus annulatus* induced by the Bm86 (Tick-GARD) vaccine. Exp Appl Acarol 2003; 29 (1-2): 141-149.

288. Lodos J, Boue O, De la Fuente J. A modelto stimulate the effect of vaccination against *Boophilus* ticks on cattle. Vet Parasitol 2000; 87: 315-326.

289. Odongo D, Kamau L, Skilton R, et al. Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. Vaccine 2007; 25 (7): 1287-1296.

290. Mahoney DF. Bovine babesiosis: the immunization of cattle with killed *Babesia argentina*. Exp Parasitol 1967; 20: 125-129.

291. Edelhofer R, Kanout A, Schuh M, et al. Improved disease resistance after *Babesia divergens* vaccination. Parasitol Res 1998; 84: 181-187.

292. Bock RE, De Vos AJ, Lew AE, et al. Studies on failure of T strain live *Babesia bovis* vaccine. Aust Vet J 1995; 72: 296-300.

293. Standfast NF, Bock RE, Wiecek MM, et al. Overcoming constraints to meeting increased demand for *Babesia bigemina* vaccine in Australia. Vet Parasitol 2003; 115: 213-222.

294. Wright IG, Casu R, Commins MA, et al. The development of a recombinant *Babesia* vaccine. Vet Parasitol 1992; 44: 3-13.

295. Schetters TP, Kleuskens J, Carcy B, et al. Vaccination against large *Babesia* species from dogs. Parassitologia 2007; 49: 13-17.

296. Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, et al. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina, Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. Vet Parasitol 1993; 50(1-2): 69-81.

297. Oliveira-Sequeira TC, Oliveira MC, Araujo JP Jr, et al. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. Int J Parasitol 2005; 35(1):105-111.

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

299. Nari A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. Vet Parasitol 1995; 57: 153-165.

300. Oura CA, Bishop RP, Wampande EM, et al. Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. Int J Parasitol 2004; 34(5):603-613.

301. Criado-Fornelio A, Rey-Valeiron C, Buling A, et al. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. Vet Parasitol 2007; 144(3-4): 261-269.

302. Criado A, Martinez J, Buling A, et al. New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. Vet Parasitol 2006; 142(3-4): 238-247.

303. Luo J, Yin H, Guan G, et al. A comparison of small-subunit ribosomal RNA gene sequences of bovine *Babesia* species transmitted by *Haemaphysalis* spp. in China. Parasitol Res 2005; 95(2):145-149.

304. LeRoith T, Berens SJ, Brayton KA, et al. The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 hypervariable region induces surface-reactive antibodies that block merozoite invasion. Infect Immun 2006; 74(6): 3663-3667.