

Babesia bovis'in msa-2c Geninin Moleküler Karakterizasyonu

Molecular Characterization of *Babesia bovis* msa-2c Gene

Ahmet Yavuz, Abdullah İnci, Önder Düzlü, Zuhale Bişkin, Alparslan Yıldırım

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışma, Ege Bölgesi'ndeki bir sığırdan saptanan *Babesia bovis* izolatının msa-2c gen bölgesinin moleküler karakterizasyonunun ortaya konulması, Türkiye ve Dünya'daki diğer benzer suşlarla benzerliklerinin kıyaslanması amacıyla yapılmıştır.

Yöntemler: 2008-2010 tarihleri arasında Marmara ve Ege Bölgesi'ndeki 9 ilden toplam 235 sığırdan kan örnekleri toplanmıştır. Kan örneklerinden mikroskopik muayene amacıyla frotiler hazırlanmış, moleküler analiz için de genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar RLB testiyle *Babesia* türleri yönünden incelenmiştir. *Babesia bovis* olduğu saptanan bir örneğin, msa-2c gen bölgesine spesifik primerlerle PCR'ı yapılmış, elde edilen amplicon jel pürifiye edilerek sekanslanmıştır. Elde edilen DNA dizisi GenBank'a kaydedilmiş, Türkiye ve Dünya'daki diğer benzer suşlarla identiklik dereceleri araştırılmıştır.

Bulgular: Mikroskopik incelemede babesiosis'e rastlanmamıştır. RLB sonuçlarına göre Marmara Bölgesi'nde babesiosis'e rastlanmaz iken Ege Bölgesi'nde incelenen sığırlardan birinde *B. bovis* pozitifliği belirlenmiştir. Toplam incelenen 235 sığırdan *B. bovis* moleküler prevalansı %0.42 olarak saptanmıştır. Sekanslanan *B. bovis* izolatının msa-2c gen bölgesine göre Türkiye'deki diğer suşlarla %91-92, Dünya'daki benzer suşlarla ise %89-96 oranında identiklik gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç: Bu çalışma ile Ege Bölgesi'nde bir sığırdan saptanan *B. bovis*'in msa-2c gen bölgesinin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. (Türkiye Parazitol Derg 2011; 35: 140-4)

Anahtar Sözcükler: *Babesia bovis*, Marmara ve Ege Bölgesi, moleküler karakterizasyon, msa-2c, sığır

Geliş Tarihi: 24.03.2011

Kabul Tarihi: 04.08.2011

ABSTRACT

Objective: This study was carried out to determine the molecular characterization of msa-2c gene of one *Babesia bovis* isolate from cattle in the Aegean Region and to compare identities with similar isolates from the World and Turkey.

Methods: Between 2008-2010 blood samples were collected from a total of 235 cattle localized in 9 provinces of the Marmara and Aegean Regions. Smears were prepared, genomic DNA's were extracted from the blood samples and investigated for *Babesia* species by RLB. PCR was performed on one sample determined as *B. bovis*, the obtained amplicon was purified, sequenced and deposited to GenBank. Identities with similar isolates from Turkey and the World were investigated.

Results: Bovine babesiosis was not determined in the microscopic examination. According to the RLB results there was no *B. bovis* positivity in cattle from the Marmara Region, while only one *B. bovis* positivity was detected in cattle from the Aegean Region. The molecular prevalence of *B. bovis* was determined as 0.42% in the total of the examined 235 cattle. The sequenced *B. bovis* isolate shared 91-92% and 89-96% identities with the isolates from Turkey and the World, respectively.

Conclusion: Molecular characterization of msa-2c gene region of *B. bovis* detected from cattle in the Aegean Region was carried out in this study. (Türkiye Parazitol Derg 2011; 35: 140-4)

Key Words: *Babesia bovis*, Marmara and Aegean Region, molecular characterization, msa-2c, cattle

Received: 24.03.2011

Accepted: 04.08.2011

GİRİŞ

Babesiosis; Apicomplexa anaç altındaki *Babesia* türlerinin meydana getirdiği, tropik ve subtropik bölgelerdeki evcil ve yabani hayvanlar ile insanlarda da görülen, vektör keneler tarafından transovarial ve transstadial olarak nakledilen zoonotik karakterli bir protozoer hastalıktır. Hastalık özellikle yaz aylarında vektör kenelerin aktifleşmesiyle birlikte yüksek ateş, anemi, anoreksi, kaşeksi, hemoglobini düşürme, hipotansiyon ve seyretilme ile ölüm- lere neden olmaktadır (1).

Sığırlarda bu hastalığa *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *B. major* ve *B. divergens* türleri yol açmaktadır (2). Sığırlarda en sık görülen türlerden biri olan ve zoonotik öneme de sahip olan *B. bovis*'in eritrositler içerisindeki merozoitleri; armut, yuvarlak veya düzensiz şekillidirler. *Babesia bovis* merozoitleri, 1.5-2.4 µm büyüklüğünde olup genellikle eritrositlerin ortasına yerleşirler (3). Bu merozoitler elektron mikroskopta incelendiğinde bunların yüzeyinde bir membran bulunduğu görülmüş ve bunun merozoit yüzey antijenleri olduğu ortaya konulmuştur. *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 antikolar ise parazitin konak eritrositlerine girişine engel olur (4). *Babesia bovis*'te; *msa-1*, *msa-2a₁*, *msa-2a₂*, *msa-2b* ve *msa-2c* olmak üzere beş adet merozoit yüzey antijeni bulunur. Bunu yanında eritrositlere invazyonda kullanılan ikinci ligand ise merozoitlerin roptri ve mikronem proteinleridir (5). Bu proteinlerden *B. bigemina*'da gp45 ve gp55; her iki *Babesia* türünde ise ortak rhoptry-associated protein-1 (rap-1a, rap-1b, rap-1c) yer alır. Bunların dışında *B. divergens*'de Bd37, *B. canis*'de Bc28 (6, 7) ve *B. gibsoni*'de P50 (8, 9) genleri bulunur. Dünyada *B. bovis*'e karşı aşı geliştirilmesi konusunda öncelikle parazitin merozoitlerinin eritrositlere tutunmasının engellenmesi amaçlanmıştır. *msa-2c*, babesioise karşı aşı geliştirilmesi çalışmalarında kullanılan, parazite ait proteinlerden birisidir. *msa-2c* geni intronless tek-kopya genlerinden olup 795 bp uzunluğunda nükleotid dizisi ihtiva eder ve 30-kDa büyüklüğündeki glikoprotein kısmının translasyonunu ve kodlamasını sağlar (5). Farklı coğrafik bölgelerdeki *B. bovis* izolatları arasında bu gen bölgesinin antijenik benzerliği daha yüksektir. Ayrıca yapısında, yüksek oranda nötralizasyonduyarlı antikoların ortaya çıkmasını sağlayan B hücre epitoplarını içermektedir. Bu özelliğinden dolayı aşı çalışmalarında diğer yüzey antijenlerine göre daha etkin olduğu tespit edilmiştir (5, 10-16). Bunun yanında *Babesia* türlerinden *B. bovis*'de P0 ve salgı proteinleri; rap-1, ama-1, TRAP, sbp-1, sbp-2, sbp-3 (5, 6, 9), *Babesia bigemina*'da ise yüzey proteinleri; gp45, gp55, BbIP0 ve salgı proteinleri; rap-1a, rap-1b, rap-1c bulunur (9, 17). *Babesia divergens*'te yüzey antijeni Bd37 ve salgı antijeni rap-1 (18); *B. canis*'te yüzey antijeni Bc28 ve salgı antijeni rap-1 (7); *B. gibsoni*, *B. caballi* ve *B. equi*'de sırasıyla yüzey antijeni olarak BgP0, BcP0 ve BeP0 (9) bulunmaktadır.

Sığır babesiosis'inin moleküler prevalansı konusunda Türkiye'de sınırlı sayıda çalışma olup; PCR ile Ankara yöresinde %12.68, Burdur yöresinde %8 ve Samsun yöresinde %3.85 (19); RLB ile Ankara yöresinde %2.3 (20) ve %3.6 (21), Trakya Bölgesi'nde %1.3 (11) *B. bovis* yaygınlığı tespit edilmiştir. Ayrıca Kayseri yöresinde sığırlardan toplanan keneler üzerinde yapılan moleküler

çalışmalar sonucu *Babesia* spp. saptanmış ve bu suş *Babesia* spp. (Kayseri 1) olarak GenBank'a kayıt ettirilmiştir (22). Altay ve ark. (23), Doğu Karadeniz Bölgesinde sığırlarda RLB tekniği ile *B. bigemina*, *B. major* ve *Babesia* spp. prevalansını sırasıyla %0.77, %0.51 ve %1.28 olarak bildirmişler ve bu türlerinin 18S rRNA gen bölgesinin parsiyel sekans dizilimlerini ortaya koymuşlardır. Düzlü ve ark. (24) RLB sonuçlarına göre, Karadeniz Bölgesi'nde *B. bovis*'in %1.8, ve *B. bigemina*'nın %2.2, oranlarında prevalansa sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Bu çalışma ile Marmara ve Ege Bölgesi'ndeki sığırlarda *B. bovis* moleküler prevalansının araştırılması, elde edilen izolatlarda *msa-2c* gen bölgesinin moleküler karakterizasyonu ve GenBank'a kayıtlarının yapılması ile Dünya'daki ve Türkiye'deki benzer suşlarla filogenetik olarak akrabalık derecelerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kan örneklerinin toplanması

2008-2010 yıllarının çeşitli dönemlerinde Marmara ve Ege Bölgesi'ndeki 9 vilayete bizzat gidilerek veya Tarım İl Müdürlüklerindeki Veteriner Hekimler ve serbest çalışan Veteriner Hekimlerle temasa geçilerek, meraya çıkmış ve rastgele seçilen toplam 235 sığırdan (Aydın: 61, Balıkesir: 16, Bursa: 14, Çanakkale: 32, İstanbul: 73, İzmir: 15, Kocaeli: 6, Kütahya: 6, Sakarya: 12) alınan kan örnekleri çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

Her bir sığırın vena jugularis'inden tekniğine uygun olarak 5 ml'lik steril EDTA'lı (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate) tüplere kan örnekleri alınmış, protokol numarası verilerek soğuk zincirde laboratuvara getirilmiştir.

Kan frotilerinin mikroskopik muayenesi

Kan örneklerinden her bir hayvan için sürme preparatlar hazırlanmıştır. Frotiler havada kurutulduktan sonra metil alkolde 5 dakika tespit edilmiş ve %5'lik Giemsa boya solüsyonu (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 mikroskopu altında immersiyon yağı damlatılarak x100'lük objektif ile *Babesia* ve *Theileria* türleri yönünden incelenmiştir.

Reverse Line Blotting (RLB)

Sığır kanlarından DNA ekstraksiyonu AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA ekstraktları kullanılabildiği kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Reverse Line Blotting (RLB) testinde kullanılacak amplikonların elde edilmesi amacıyla yapılan PCR'da primer olarak *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S rRNA (ribosomal RNA) geninin değişken V4 bölgesinden, büyüklüğü yaklaşık 390 ile 430 bp (base pair) arasında değişen bir parçayı amplifiye eden genel primerler (25) kullanılmıştır.

RLB'de kullanılan probalar, 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)-C₆ aminolinker) içerecek şekilde Genset (Fransa), Isogen (Hollanda) ve MWG (Almanya) firmalarına sen-

tezlettirilmiştir. Probların sekans dizilimleri, Gubbels ve ark. (26) ve Georges ve ark. (25)'na göre alınmıştır. PCR ile elde edilen ampliconlar, önceden problemlerin yüklendiği RLB membranına yüklenmiş ve hibridizasyona tabi tutulmuştur. RLB sonuçlarının değerlendirilmesinde hiper filmler üzerinde prob ve PCR ürünlerinin döküldüğü sıraların kesiştiği yerlerde meydana gelen siyah lekeler pozitif olarak kabul edilmiştir.

msa-2c'nin DNA diziliminin belirlenmesi ve filogenetik analizi

Babesia bovis olduğu kesin olarak tespit edilen DNA örnekleri, *msa-2c* antijenininin 798 bp'lik gen bölgesini amplifiye eden primerler (12) kullanılarak tekrar PCR'a tabi tutulmuştur. PCR sonucunda elde edilen ampliconlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jelden pürifiye edilmiştir.

Jel pürifiye edilen Aydın ilinden bir örneğe ait *Babesia bovis* ampliconları *msa-2c* antijenininin 798 bp'lik gen bölgesini amplifiye eden aynı primerler (12) ile çift yönlü olarak hizmet alımı ile (İontek A.Ş., İstanbul) sekanslatılmıştır. Dizilime sonuçları, BioEdit Sequence Alignment programı ile incelenerek örneklerin sekans dizilimleri ortaya çıkarılmıştır (27). Elde edilen sekans dizilimlerinin internet ortamında Genbank'ta BLAST analizleri yapılarak Dünya'daki ve Türkiye'deki aynı suşlarla identiklik yüzdeleri belirlenmiştir. Örnekler Genbank'a kayıt ettirilmiş ve aksesyon numaraları alınmıştır. Örneklerin filogenetik analizleri ise Mega 5.0 programı ile yapılmıştır (28).

BULGULAR

Mikroskopik bulgular

Mikroskopik inceleme sonucunda babesiosis yol açan piroplazmik formlar tespit edilememiştir.

RLB sonuçları

Marmara bölgesinde *Babesia* türleri tespit edilememiştir. Ege Bölgesi'nde Aydın ilinde incelenen 61 sığırdan sadece birinde (%1.64) *B. bovis* tespit edilmiştir. İncelemesi yapılan toplam 235 sığır örneğinde *B. bovis* prevalansı ise %0.42 bulunmuştur.

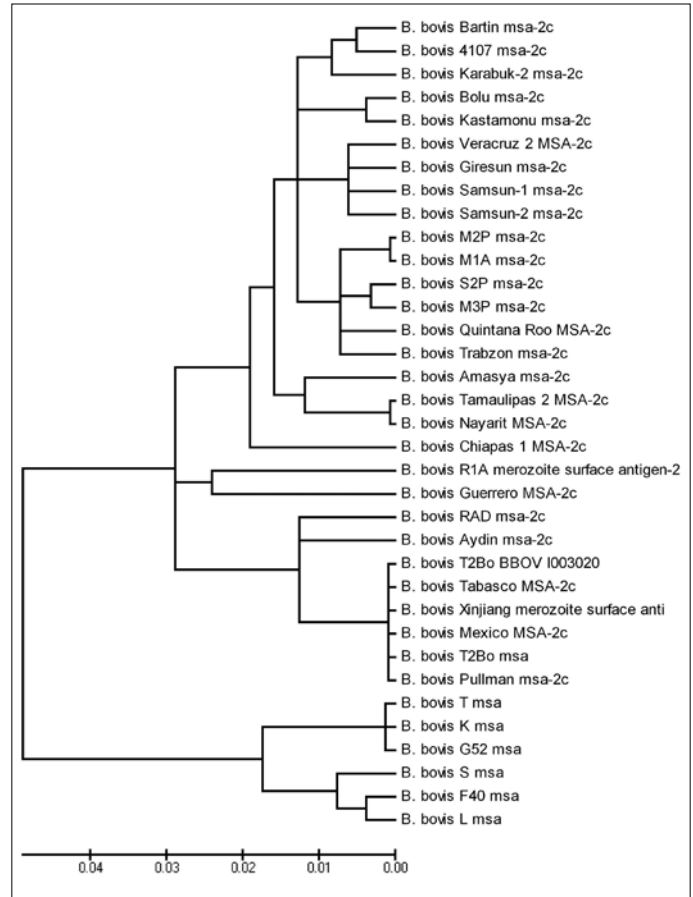
Msa-2c geninin filogenetik analizi

Ege Bölgesi'ndeki sığırlardan elde edilen ve *Babesia bovis* olduğu tespit edilen bir örnek (*B. bovis* Aydın *msa-2c*) sekans analizleri sonucu HM117270 aksesyon numarası ile GenBank'a kayıt ettirilmiştir. Elde edilen *B. bovis* Aydın *msa-2c* gen dizilimi Dünya'daki ve Türkiye'deki kayıtlı diğer sekanslarla kıyaslanmış ve filogenetik ağaç şeklinde Şekil 1'de gösterilmiştir. Multible alignmentlar sonucu Aydın izolatı ile Türkiye'deki diğer *msa-2c* izolatları arasında %91-92, Dünya'daki diğer bazı *msa-2c* izolatları ile arasında ise %89-96 oranında identiklik belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Babesiosisin teşhisinde eskiden beri mikroskopik 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 (29, 30).

Babesia bovis'in moleküler prevalansı; Ankara yöresinde %2.3-12.68, Burdur yöresinde %8 ve Samsun yöresinde %3.85 (19) ve Trakya Bölgesi'nde %1.3 (11) olarak rapor edilmiştir. Kayseri yöresinde keneler üzerinde yapılan moleküler çalışmada belirlenen



Şekil 1. *Babesia bovis* izolatlarının *msa-2c* gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbor-joining)

Babesia spp. (Kayseri 1) izolatı GenBank'a kayıt ettirilmiştir (31). Diğer yandan Altay ve ark. (23), Doğu Karadeniz Bölgesinde *B. bigemina*, *B. major* ve *Babesia* spp. prevalansını sırasıyla %0.77, %0.51 ve %1.28 olarak bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar (23) saptadıkları izolatların 18S rRNA gen bölgesine göre parsiyel sekans dizilerini ortaya koymuşlardır. Düzlü ve ark. (24), Karadeniz Bölgesi'nde *B. bovis*'in %1.8, ve *B. bigemina*'nın %2.2, oranlarında prevalansa sahip olduğunu kaydetmişler ve *B. bovis* izolatların *msa-2c* gen bölgesinin sekans dizileri ortaya koyarak moleküler olarak karakterize etmişler ve GenBank kayıtlarını sağlamışlardır.

Marmara Bölgesi'nde RLB ile yapılan bu çalışmada *B. bovis*'in moleküler prevalansı belirlenememiştir. Aydın ilinden örneklenen sığırlarda *B. bovis*'in moleküler prevalansı %1.63, genel olarak Ege bölgesinde ise %1.02 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları daha önce aynı bölgelerde PCR ile yapılan moleküler çalışma (19) sonuçlarını doğrulamıştır.

Son yıllarda babeiosis'e karşı kullanılan attenüe canlı aşılardan yeri ne subunit aşılardan 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 adayları antijenleri kodlayan gen bölgelerinin araştırılması, bu bölgelerin değişken ve konservatif özelliklerinin saptanması ve bu özelliklerin dünyanın farklı bölgelerindeki suşlarda farklılıklar gösterip göster-

mediğinin 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*, *msa2a₁*, *msa2a₂*, *msa-2b* ve *msa-2c* gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonu ile ilgili olarak Türkiye'de bugüne kadar sadece Düzlü ve ark. (24) tarafından Karadeniz Bölgesi'nde benzer bir çalışma yapılmıştır. Bu gen bölgeleri ile ilgili çalışmaların Dünya'da da kısıtlı olduğu görülmektedir (5, 10-16).

msa-2c gen bölgesi ile yapılan bir çalışmada (32) bu gen bölgesinin yüksek oranda immunojenik olduğu, sığırlarda B hücre epitoplarnı yüksek oranda muhafaza ettiği saptanmıştır. Hem heterolog 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 epitoplarnı 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 epitoplarnı ihtiva etmesinden kaynaklandığını rapor etmişlerdir (32). Wilkowsky ve ark. (32) 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. (10), *B. bovis*'e ait *msa-2* proteinleri üzerine yaptıkları bir çalışmada Avustralya orijinli 12 izolat ile Amerika orijinli 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. (15), nötralizasyona duyarlı B hücre epitoplarnı içeren *msa-2* proteinlerinden *msa-2a₁*, *msa-2b* ve *msa-2c* genlerinin aminoasit sekanslarını karşılaştırmışlardır. Arjantin kaynaklı R1A suşu ile Arjantin, Amerika Birleşik Devletleri ve Meksika'dan elde edilen izolatların *msa-2a₁*, *msa-2b* ve *msa-2c* gen bölgeleri arasında kıyaslama yapmışlardır. Buna göre; *msa-2a*, 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. (5) Arjantin R1A ve Meksika Mo7 suşlarını; *msa-2a₁*, *msa-2a₂*, *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-2a₁*, *msa-2b* ve *msa-2c*'de B hücre epitoplarnı varlığını gösterirken, *msa-2a₂*'de bu hücre epitoplarnı rastlayamamışlardır. Borgonio ve ark. (12) 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 araştırmacılar *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. (33) 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 Ege Bölgesinde sığırlardan elde edilen konserve karakterli *B. bovis* *msa-2c* gen bölgesinin Dünya'dan ve Türkiye'den diğer benzer izolatlarla karşılaştırılması yapılmıştır. Elde edilen *B. bovis* Aydın *msa-2c* izolatı ile Türkiye'deki aynı gen bölgesinin incelendiği diğer izolatlar ile aralarında %91-92, Dünya'daki benzer diğer izolatlarla ise %89-96 oranında identiklik gösterdikleri belirlenmiştir. İzolatlar arasındaki bu yüksek benzerlik, diğer araştırmacıların bildirdiği gibi (5, 10, 12, 32, 33) *msa-2c* gen bölgesinin korunmuş bir bölge olduğunu göstermektedir. Bunun yanında filogenetik analiz sonucu belirlenen identiklik, geçmişteki tarihte sürece bölgeye gelen ithal hayvan hareketleriyle de ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

SONUÇ

Bu çalışma ile, Ege Bölgesi'nde *B. bovis*'in *msa-2c* gen bölgesinin moleküler karakterizasyonu yapılarak Türkiye'nin biyolojik varlığının moleküler karakteri olarak GenBank'a tescilli sağlanmış. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların, gelecekte Türkiye'ye özgü suşlarla yapılacak aşı çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Yazarlar, aynı başlıklı Doktora tezinden özetlenen bu çalışmanın yapılmasında maddi desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: TSD-09-700) ve Avrupa Birliği 6. Çerçeve Programı kapsamında MEDLABAB (INCO-003691) projesine teşekkür ederler.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Uilenberg G. Babesia -A historical overview. Vet Parasitol 2006; 138: 3-10.
2. Açıcı M. Samsun ve yöresi sığırlarında kan parazitlerinin yayılışı. Etlik Vet Mik Derg 1995; 8: 271-7.
3. Friedhoff KT. Transmission of Babesia. In: Ristic M, editör. Babesiosis of Domestic Animals and Man. Boca Raton, Florida, CRC Pres; 1988. p. 23-52.
4. James MA. Application of exoantigens of Babesia and Plasmodium in vaccine development. Trans R Soc Trop Med Hyg 1989; 83: 67-72. [CrossRef]

5. Florin-Christensen M, Suarez CE, Hines SA, Palmer GH, Brown WC, McElwain TF. The Babesia bovis merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. *Infect Immun* 2002; 70: 3566-75. [CrossRef]
6. Suarez CE, Florin-Christensen M, Hines SA, Palmer GH, Brown WC, McElwain TF. 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: 6865-70. [CrossRef]
7. Carcy B, Précigout E, Schetters T, Gorenflot A. Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of Babesia and resulting antigenic diversity. *Vet Parasitol* 2006;138: 33-49.
8. Fukumoto S, Tamaki Y, Shirafuji H, Harakawa S, Suzuki H, Xuan X. 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: 557-9. [CrossRef]
9. Terkawi MA, Jia H, Zhou J, Lee EG, Igarashi I, Fujisaki K, et al. Babesia gibsoni ribosomal phosphoprotein P0 induces cross-protective immunity against B. microti infection in mice. *Vaccine* 2007; 25: 2027-35. [CrossRef]
10. Berens SJ, Brayton KA, Molloy JB, Bock RE, Lew AE, McElwain TF. Merozoite surface antigen 2 proteins of Babesia bovis vaccine breakthrough isolates contain a unique hypervariable region composed of degenerate repeats. *Infect Immun* 2005; 73: 7180-9. [CrossRef]
11. Bilgin Z. Trakya'da sığırlarda bulunan Theileria ve Babesia türlerinin ve bunların sığırlarda yaygınlığının reverse line blotting (RLB) tekniği ile araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2007.
12. Borgonio V, Mosqueda J, Genis AD, Falcon A, Alvarez JA, Camacho M, et al. msa-1 and msa-2c gene analysis and common epitopes assessment in Mexican Babesia bovis isolates. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1149:145-8. [CrossRef]
13. Çakmak A. Untersuchungen zur inzidenz von haemoparasiten in der provinz Ankara. Tierarztl Hochsch Diss Hannover. 1987.
14. Dinçer Ş, Sayın F, Karaer Z, Çakmak A, Friedhoff KT, Müller I ve ark. Karadeniz bölgesi sığırlarında, bulunan kan parazitlerinin sero-insidensi üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1991; 38: 206-26.
15. Dominguez M, Echaide I, Echaide ST, Mosqueda J, Cetrá B, Suarez CE, 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: 216-26. [CrossRef]
16. Dumanlı N, Özer E. Elazığ yöresinde sığırlarda görülen kan parazitleri ve yayılışları üzerinde araştırmalar. Selçuk Üniv Vet Fak Derg 1987; 3: 159-66.
17. 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: 3782-90. [CrossRef]
18. Delbecq S, Precigout E, Vallet A, Carcy B, Schetters TP, Gorenflot A. Babesia divergens: cloning and biochemical characterization of Bd37. *Parasitology* 2002; 125: 305-12. [CrossRef]
19. Tanyüksel M, Vatanserver Z, Karaer Z, Araz E, Haznedaraoğlu T, Yukarı BA, ve ark. Sığır babesiosisinin epidemiyolojisi ve zoonotik önemi. *T Parazitol Derg* 2002; 26: 42-7.
20. İça A. Sığırlarda bazı Babesia türlerinin indirek floresan antikor ve reverse line blotting yöntemi ile karşılaştırmalı tanısı. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2004; 1: 77-85.
21. Vatanserver Z, İça A, Deniz A, Nalbantoğlu S, Karaer Z, Çakmak A, ve ark. Ankara yöresinde sığırlarda kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının yayılışının reverse line blotting (RLB) ve indirek floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Tebliğ Özetleri; Konya: 2003. p. 194.
22. İnci A, İça A, Florin-Christensen M, Vatanserver Z, Yıldırım A, Düzlü Ö, et al. 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 163-4.
23. Altay K, Aktas M, Dumanlı N, Aydın MF. 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: 319-23. [CrossRef]
24. Düzlü Ö, İnci A, Yıldırım A. Karadeniz Bölgesi'ndeki Sığırlardan Elde Edilen Babesia bovis Suşlarının Moleküler Karakterizasyonu. *Kayseri: ERÜ Sağlık Bil Derg* 2011; 20: 18-28.
25. Georges K, Loria GR, Riili S, Greco A, Caracappa S, Jongejan F, 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: 273-86. [CrossRef]
26. Gubbels MJ, De Vos S, Van Der Weide M, Viseras J, Schouls LM, De Vries E, et al. Simultaneous detection of bovine Theileria and Babesia species using reverse line blotting hybridization. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1782-9.
27. Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series* 1999; 41: 95-8.
28. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Molecular Biology and Evolution* (submitted). *Mol Biol Evol* 2011. [CrossRef]
29. Skotarczak B. Babesiosis of human and domestic dog; etiology, pathogenesis, diagnostics. *Wiad Parazytol* 2007; 53: 271-80.
30. Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor SM, Gray JS. Babesia divergens, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 622-36. [CrossRef]
31. İça A, Vatanserver Z, Yıldırım A, Duzlu O, İnci A. Detection of Theileria and Babesia species in ticks collected from cattle. *Vet Parasitol* 2007; 148: 156-60. [CrossRef]
32. Wilkowsky SE, Farber M, Echaide I, Torioni de Echaide S, Zamorano PI, Dominguez M, 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: 133-41. [CrossRef]
33. Genis AD, Mosqueda JJ, Borgonio VM, Falcón A, Alvarez A, Camacho M, et al. Phylogenetic analysis of Mexican Babesia bovis isolates using msa and ssrRNA gene sequences. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1149: 121-5. [CrossRef]