

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI



***Taenia multiceps* HSP70 Geninin Klonlanması,
Ekspresyonu, Rekombinant Proteinin Karakterizasyonu
ve Test Kiti Özelliğinin Araştırılması**

DOKTORA TEZİ

Şeyma GÜNYAKTI KILINÇ

2020

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mesut AKSAKAL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK

Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU

Prof. Dr. Kadir SERVİ

Prof. Dr. Abdurrahman GÜL

Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK

Prof. Dr. Armağan Erdem ÜTÜK



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı: Şeyma GÜNYAKTI KILINÇ

Tarih:

İmza:

Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK

Parazitoloji Anabilim Dalı

ELAZIĞ

İTHAF

Tezimi, beni yetiştiren, büyüten, akademik hayata yönlendiren ve bu yolda yürürken desteklerini benden esirgemeyen, yoluma ışık tutan canım babam **Mikdat GÜNYAKTI**'ya ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her türlü desteği sağlayan, her zaman en iyi olmam için benden desteklerini esirgemeyen, bilimsel duruşunu ve çalışma prensibini kendime ilke edindiğim, gerek bilimsel birikimiyle gerekse hayat tecrübeleriyle beni yönlendiren, motive eden, bilimsel ve teknik desteğiyle beni hiç yalnız bırakmayan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Sami ŞİMŞEK'e sonsuz minnetimle teşekkür ederim.

Bu süreçte bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, desteğini her daim hissettiğim, kıymetli hocam, manevi babam Prof. Dr. Cem Ecmel ŞAKİ'ye, Anabilim dalımızın değerli hocaları Prof. Dr. Nazir DUMANLI, Prof. Dr. Edip ÖZER, Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU, Prof. Dr. Münir AKTAŞ ve Doç. Dr. Sezayi ÖZÜBEK'e teşekkür ederim. Tezimin hem saha hem de laboratuvar çalışmalarında yanımda olan, gece gündüz demeden benimle çalışan ve yardımcı olan anabilim dalımız Doktora Öğrencisi Figen ÇELİK'e ve tezimin laboratuvar aşamalarında desteklerini esirgemeyen kardeşim Arş. Gör. Mehmet Can ULUÇEŞME'ye teşekkürü borç bilirim.

Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde birlikte çalıştığım saygı değer hocalarım Prof. Dr. Abdurrahman GÜL ve Dr. Öğr. Üyesi Harun Kaya KESİK'e tezimi yürütmemde sağlamış oldukları desteklerden dolayı teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar aşamalarında, teknik altyapı ve bilimsel birikimleriyle desteklerini esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM'a, Fırat Üniversitesi Veteriner

Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Şükrü TONBAK ve Arş. Gör. Dr. Hasan ABAYLI'ya, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Gökhan Kürşad İNCİLİ'ye, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Dr. Burak KARABULUT'a, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nden Dr. Öğr. Üyesi Doruk ENGİN ve Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nden Dr. Öğr. Üyesi Venhar ÇELİK hocalarıma teşekkür ederim. Yine tezimin saha çalışmalarında beni yalnız bırakmayan her türlü manevi desteğini hissettiğim biricik dostum Arş. Gör. Funda AKSÜNGER KARAAVCI'ya çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca sevgi ve desteklerini benden esirgemeyen, beni bugünlere getiren, yaşadığım her zorlukta ve güzellikte benimle olduklarını hissettiren, haklarını ödeyemeyeceğim canım babam Mikdat GÜNYAKTI ve canım annem Arzu GÜNYAKTI'ya, kardeşlerim Rümeysa GÜNYAKTI KAHYE ve Elif Sena GÜNYAKTI'ya desteklerinden ötürü sonsuz teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarımın her aşamasında, yaşadığım bütün sıkıntı ve zorluklarda yalnız olmadığımı hissettiren, varlığıyla bana güç veren, manevi desteğini ve sevgisini bir an olsun eksik etmeyen, bu yolda beraber yürüdüğüm hayat arkadaşım, sevgili eşim Arş. Gör. Mehmet Akif KILINÇ'a en samimi ve içten duygularıyla teşekkür ederim.

Son olarak bu tez çalışmasına maddi destek sağladığı için TÜBİTAK'a (Proje No: 119O014) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
1. ÖZET	xiii
2. ABSTRACT	xv
3. GİRİŞ	1
3.1. Taenia multiceps'in morfolojisi	2
3.2. Taenia multiceps'in yaşam döngüsü	3
3.3. Coenurosis'in Epidemiyolojisi	4
3.3.1. Coenurosis'in Dünya'daki Yaygınlığı	5
3.3.2. Coenurosis'in Türkiye'deki Yaygınlığı	7
3.4. Coenurosis'in Zoonotik Önemi	8
3.5. Coenurosis'in Ekonomik Önemi	9
3.6. Coenurosis'in Klinik ve Patolojik Bulguları	10
3.7. Coenurosis'in Teşhisi	13
3.8. Coenurosis'in Tedavisi	16
3.9. Coenurosis'te Koruma ve Kontrol	18
3.10. Coenurosis'te İmmünite	19
3.11. Coenurosis'te Aşı Çalışmaları ve Aşı Adayı Proteinler	21
3.12. Heat Shock Protein (HSP)'ler	22
4. GEREÇ VE YÖNTEM	28
4.1. Coenurus cerebralis Kistinin Elde Edilmesi	28
4.2. Kan-Serum Örneklerinin Toplanması	28
4.3. Laboratuvar Çalışmaları	29
4.4. Total RNA ve mRNA İzolasyonu	30
4.5. Reverse-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) Yöntemi ile cDNA eldesi	31

4.6. Vektör Seçimi	33
4.7. Primer Dizaynı ve Proteinin İn Silico Analizi	34
4.8. Taenia multiceps Heat Shock Protein 70 (HSP70) Geninin Çoğaltılması	35
4.9. Restriksiyon Enzimleri İle Kesim	36
4.10. Jelden İzolasyon	37
4.11. TmHSP70 Geninin Klonlanması	38
4.11.1. TmHSP70 Geninin pET28(a) Plazmidine Ligasyonu	38
4.11.2. Kompetan E. coli DH5α Hücrelerinin Hazırlanması	39
4.11.3. Rekombinant Plazmidin E. coli DH5α Suşu Kompetan Hücrelere Transformasyonu	40
4.11.4. Koloni PZR Yöntemi ile Kolonilerin Taranması	42
4.11.5. Rekombinant Plazmidlerden Gliserol Stokların Hazırlanması	43
4.11.6. Çapraz PZR Denemeleri İçin Plazmid İzolasyonu	44
4.11.7. Çapraz PZR Kontrolleri	45
4.12. IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) Miktarı ve Ekspresyon Denemeleri	46
4.13. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) Analizi	47
4.13.1. Separasyon Jelinin (%15) Hazırlanması	49
4.13.2. Stacking Jelinin (%6) Hazırlanması	49
4.14. Rekombinant TmHSP70 Proteininin Ekspresyonu	51
4.15. Protein Pürifikasyonu	51
4.16. Western Blot Analizi	54
4.17. Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	58
5. BULGULAR	61
5.1. Kistin Elde Edilmesi	61
5.2. Taenia multiceps HSP70 Geninin Çoğaltılması	61
5.3. Plazmid Kontrolü ve İzolasyonu	62
5.4. Pilot Ekspresyon Denemeleri	68
5.5. Rekombinant Protein Pürifikasyonu ve SDS-PAGE Bulguları	70
5.6. Western Blot Bulguları	71
5.7. ELISA ve Western Blot Testlerinin Sensitivite ve Spesifite Oranları	74

5.8. ELISA Bulguları	75
6. TARTIŞMA	78
7. KAYNAKLAR	88
8. ÖZGEÇMİŞ	97
9. YAYINLAR	98



TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Kan-serum örneklerinin toplandığı yerleşim yerleri	29
Tablo 2.	RNeasy Mini Kit içeriği	30
Tablo 3.	Reverse-transkriptaz-PCR kit içeriği ve kullanım miktarları	31
Tablo 4.	RT-PZR şartları	32
Tablo 5.	Taenia multiceps tam genom sekansından dizayn edilen TmHSP70 primerlerine ait nükleotid dizileri	35
Tablo 6.	TmHSP70 geninin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı	35
Tablo 7.	Restriksiyon enzimleri ile kesim protokolü	36
Tablo 8.	Ligasyon reaksiyonu içerik ve miktarları	39
Tablo 9.	Koloni PZR reaksiyon karışımı ve miktarları	43
Tablo 10.	Separasyon jelinin içeriği ve kullanılan miktarlar	49
Tablo 11.	Stacking jelinin içeriği ve kullanılan miktarlar	49
Tablo 12.	HisPur™ Ni-NTA Spin Purification Kit içeriği	52
Tablo 13.	Sahadan toplanan serumların ELISA sonuçlarına göre rastgele seçilenlerinin western blot testi sonuçları.	77

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	<i>Taenia multiceps</i> 'in yaşam döngüsü	4
Şekil 2.	RT-PZR için kullanılan ısı döngü cihazı	32
Şekil 3.	pET-28 (a) vektör haritası	33
Şekil 4.	pET- 28 (a) klonlama bölgesi ve enzim kesim bölgeleri	34
Şekil 5.	LB Agar besi yeri hazırlık ve ekim aşamaları	42
Şekil 6.	Kit prosedürünün ikinci basamağından sonra oluşan mavi renk	44
Şekil 7.	SDS-PAGE aşamaları	51
Şekil 8.	Western-Blot ıslak transfer sistemi	58
Şekil 9.	Nekropsi sonucunda elde edilen <i>Coenurus cerebralis</i> kisti	61
Şekil 10.	TmHSP70 primerleriyle çoğaltılmış cDNA'nın PZR görüntüsü	62
Şekil 11.	pET-28(a) vektörünün PZR kontrol bulguları	63
Şekil 12.	LB katı besiyerinde oluşan kolonilerin görüntüsü	64
Şekil 13.	İkinci kez besiyerine ekimi yapılan kolonilerin görüntüsü	64
Şekil 14.	T7 forward-T7 reverse primerleri kullanılarak kurulan koloni PZR tarama sonuçları	65
Şekil 15.	Çapraz PZR işlemi sonucunda elde edilen band büyüklükleri	66
Şekil 16.	T7-F ve T7-R primerleri kullanılarak yapılan çift yönlü dizileme bulgusu	67
Şekil 17.	Dizileme analizi sonucu elde edilen nükleotid dizisine ait Open Reading Frame (ORF) analiz sonuçları.	67
Şekil 18.	TmHSP70 protein dizisine ait Protein BLAST analiz sonucu ve benzerlik oranları.	68
Şekil 19.	Farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin SDS-PAGE analizi görüntüsü	69

Şekil 20.	0,5 mM IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin SDS-PAGE analizi görüntüsü	69
Şekil 21.	Farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin SDS-PAGE analizi görüntüsü	70
Şekil 22.	Pürifikasyon işlemi sonrasında elde edilen rekombinant TmHSP70 proteininin (23 kDa) SDS-PAGE jel görüntüsü, M: Prestained protein markeri	71
Şekil 23.	<i>Coenurus cerebralis</i> pozitif koyun serumlarının (1-3) kullanıldığı western blot bulguları	72
Şekil 24.	<i>Coenurus cerebralis</i> negatif koyun serumlarının (1-7) kullanıldığı western blot bulguları	73
Şekil 25.	Çapraz reaksiyonların değerlendirildiği western blot analizi	73
Şekil 26.	Substrat ve durdurma solüsyonu eklenmiş ELISA pleyt görüntüsü	76

1. ÖZET

Taenia multiceps, erişkin formu köpek ve diğer etçillerin ince bağırsaklarında yaşayan taeniid bir sestoddur. Larvası, *Coenurus cerebralis* olarak bilinir ve koyun ve diğer ruminantların beyin ve medulla spinalisleri de içine alan sinir sisteminde yerleşmektedir. Kistin varlığı tipik nörolojik semptomlara sebep olur ve vakaların çoğu hayvanların ölümüyle sonuçlanır. Coenurosis, yaygın olarak genç hayvanları etkilemesinden dolayı koyun çiftliklerinde önemli ekonomik kayıplara neden olabilir.

Bu tezin amacı, koyunlarda *T. multiceps* HSP70 geni tarafından eksprese edilen proteinin koyun coenurosis'i'nin tanısındaki etkinliğini belirlemek ve saha şartlarında uygulanabilir bir kit geliştirmektir. Bu amaçla, *T. multiceps*'in tüm genom sekansından HSP70'i kodlayan geni çoğaltacak primerler dizayn edilerek, enfekte bir koyunun beyninden elde edilen *Coenurus cerebralis* kistinden mRNA izolasyonu yapıp takiben cDNA elde edildi. Dizayn edilen primerlerle ilgili gen bölgesi PZR ile çoğaltılıp, elde edilen ürün klonlanıp eksprese edildi. Daha sonra pürifiye edilen rekombinant proteinin etkinliği, bilinen pozitif ve negatif koyun serumları kullanılarak Western blot ile gösterildi. Ayrıca sahadan toplanan 1207 koyundan alınan serumlar ile rekombinant proteinin ELISA'daki etkinliği belirlendi.

Bu işlemler neticesinde rekombinant TmHSP70 antijeninin western blot testindeki sensitivite ve spesifite değerleri %100 iken ELISA testinin sensitivite ve spesifite oranları sırasıyla %66,6 ve %52,6 olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda

bakısı yapılan 1207 serum örneğinin 567 (%46,97)'si ELISA ile pozitif olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak rekombinant TmHSP70 antijeninin koyunlarda coenurosisin tanısında western blot temelli bir testte kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Taenia multiceps*, HSP70, koyun, klonlama, ELISA.



2. ABSTRACT

Cloning, Expression and Characterization of the *Taenia multiceps* HSP70 Gene and Investigation of the Test Kit Properties

Taenia multiceps is a taeniid cestode that lives in the small intestine of adult canines and other carnivores. Its larva is known as *Coenurus cerebralis* and is located in the nervous system of sheep and other ruminants, including the brain and medulla spinalis. The presence of the cyst causes typical neurological symptoms and most cases result in the death of the animals. Coenurosis can cause significant economic losses to sheep farms as it commonly affects young animals.

The aim of this thesis was to determine the efficacy of the recombinant protein expressed by *T. multiceps* HSP70 gene in the diagnosis of sheep coenurosis in sheep and to develop a kit applicable in field conditions. For this purpose, primers were designed to amplify the gene encoding HSP70 from the whole genome sequence of *T. multiceps*, mRNA was isolated from *C. cerebralis* cyst obtained from an infected sheep's brain and then cDNA was isolated. The gene region related to the designed primers was amplified by PCR and the product obtained was cloned and expressed. The efficiency of the recombinant protein purified afterwards was demonstrated by Western blot using known positive and negative sheep sera. In addition, the efficiency of the recombinant protein in ELISA was determined with sera collected from 1207 sheep.

As a result of these procedures, the sensitivity and specificity values of the recombinant TmHSP70 antigen in the western blot test were 100%, while the sensitivity and specificity rates of the ELISA test were 66.6% and 52.6%,

respectively. At the same time, 567 (46.97%) of the 1207 serum samples analyzed were found to be positive by ELISA.

As a result, it has been shown that recombinant TmHSP70 antigen can be used in a western blot-based test for the diagnosis of coenurosis in sheep.

Key words: *Taenia multiceps*, HSP70, sheep, cloning, ELISA.



3. GİRİŞ

Küçük ruminantlar, dünyadaki hayvansal üretim sistemlerinde oldukça önemli bir yer tutmaktadır (1). Koyunculuk ülkemiz çiftçisinin de tarih boyunca uğraştığı en önemli hayvan yetiştiriciliği alanlarından birisidir. Koyun yetiştiriciliği et, süt, yün ve deri üretimi açısından ülkemiz ekonomisinde büyük bir paya sahiptir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre 2016 yılında tarım sektörü dünya gayri safi hâsılasının %3,2'sini oluşturmakta, hayvancılık sektörü ise tarımsal gayri safi hâsılasının %37'sini oluşturmaktadır. Bu oran AB ülkelerinde %55, ABD'de %46 iken gelişmekte olan ülkelere %24'ler civarında kalmıştır (2).

Koyun ve keçi gibi küçükbaş hayvancılık sektörü, düşük başlangıç sermayesi, daha az kaynak ve bakım maliyeti, düzensiz arazilerin kullanılması, süt ve et üretme kabiliyeti ve vejetasyondan fakir meraların değerlendirilmesi gibi düşük gereksinimleri nedeniyle toplumun talebine hızlı bir şekilde yanıt vermektedir (3). Kapsamlı kullanımlarına rağmen küçükbaş hayvancılık, hastalıklar, zayıf beslenme ve yönetim ile ıslah politikaları nedeniyle istenilen seviyeye ulaşamamaktadır. Bu hastalıklar arasında helmint kaynaklı enfeksiyonlar dünyadaki koyun ve keçi verimliliğini etkileyen önemli hastalıklar arasında yer almaktadır (4). *Taenia multiceps*'in larvası olan *Coenurus cerebralis*'in koyun ve keçilerde neden olduğu Coenurosis verimliliği olumsuz yönde etkileyen hastalıkların başında gelmektedir (5).

Bu hastalık, Türkiye'de yetiştiriciler tarafından delibaş, salıncak illeti, devvare gibi isimlerle bilinmektedir. Oluşturduğu kayıplar kesin olarak bilinmemekle beraber bazen koyunlarda sürü halinde enfeksiyonlara yol açarak

büyük zararlar verebilmektedir. Coenurosis, hayvan sahipleri tarafından ilaç ile sağaltımı mümkün olmayan bir hastalık olarak bilinmekte ve yetiştiriciler bu hastalığa özgü belirtileri fark eder etmez hayvanlarını kesime sevk etmektedirler. Bundan dolayı hastalığın yaygınlığını tam olarak belirlemek mümkün olamamaktadır (6).

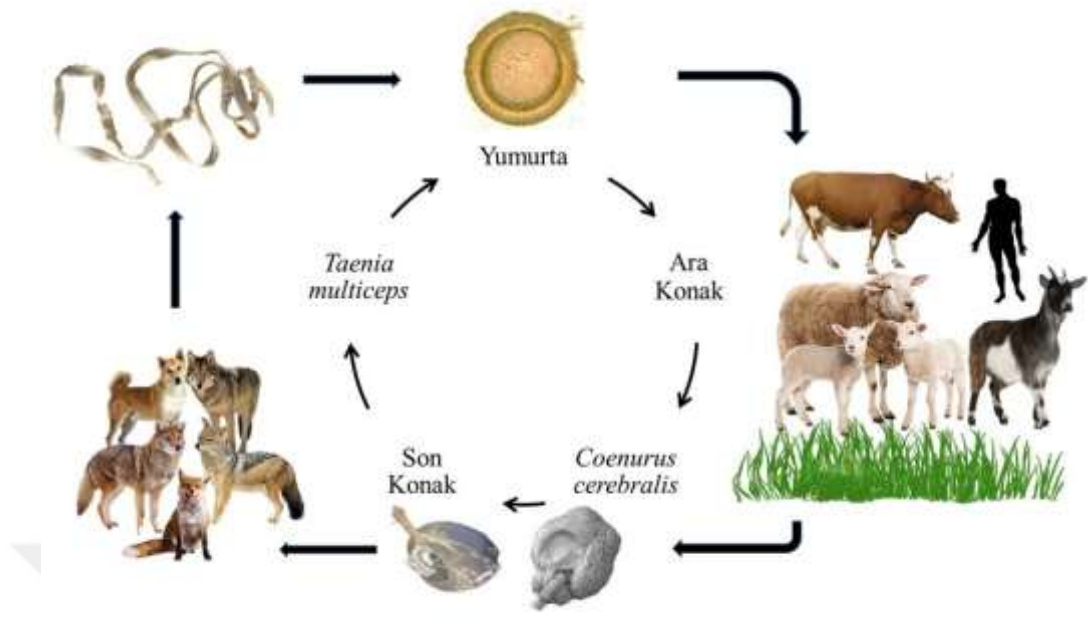
3.1. *Taenia multiceps*'in morfolojisi

Taenia multiceps, son konak köpek, tilki, kurt, çakal gibi karnivorların ince bağırsaklarına yerleşirken, larval formu olan *C. cerebralis* ise koyun, keçi, sığır, manda, deve, yak, at ve nadiren insanların merkezi sinir sistemi (MSS) ve omuriliklerine yerleşmektedir (7). Erişkin sestod, 40-100 cm uzunluğunda olup 0,8 mm çapında küçük bir skolekse sahiptir. Skoleks üzerinde dört adet çekmen ve çift sıra halinde dizilmiş 22-32 adet taenia tipi kancanın üzerinde yer aldığı rostellum bulunmaktadır. Bu kancalardan büyük olanlar 0,18-0,198 mm uzunluğunda, küçük olanlar ise 0,1-0,126 mm uzunluğundadır (8, 9). Gebe halkalar 8-12 adet arasında olup, her bir halka 3-4 mm uzunluğundadır. Gebe halkalarda uterus 18-26 adet yanal vermektedir (10). *Taenia multiceps* yumurtalarının çapı 29-37 µm olup üç çift çengelli tek onkosfer içermektedir (11).

Larva dönemi olan *C. cerebralis*, ara konakların MSS'ye yerleşmesi durumunda yaklaşık 0,8-6,5 cm çapında içi sıvı dolu kistler oluşturmaktadır. Aynı zamanda makroskopik olarak keseden içeri invagine olmuş çok sayıda protoskoleks bulunmaktadır. Bu protoskoleksler mikroskopik olarak incelendiğinde, "C" şeklinde çekmenler ve çift sıra rostellar kanca dikkati çekmektedir (12, 13).

3.2. *Taenia multiceps*'in yaşam döngüsü

Taenia multiceps'in yaşam döngüsü, son konaklar olan köpek, tilki, kurt ve çakal gibi evcil ve yabani karnivorlar ile koyun, keçi, sığır, manda, deve, yak, at ve insanları da içeren ara konaklar arasında geçmektedir (14-16). Ara konaklar, *T. multiceps*'in yumurtalarını içeren son konak dışkıları ile kontamine olmuş yiyecek ya da su alımıyla enfekte olmaktadır (17). Yumurtalar ara konak tarafından alındıktan sonra, mide ve bağırsak enzimlerinin etkisiyle embriyofor parçalanmakta ve onkosfer serbest kalmaktadır. Serbest kalan onkosfer, kan yolu ile MSS, omurilik ve nadiren kas içi ve deri altı dokulara ulaşmaktadır (17). MSS'ye ulaşan onkosferler, 2-8 ayda larval dönemi oluşturmak üzere gelişmekte ve klinik belirtilerin oluşmasına yol açmaktadır. Larval dönemin farklılaşması, beslenmesi ve büyümesi için beyin omurilik sıvısının gerekli olmasından dolayı *T. multiceps*'in onkosferi, sinir dokusu için belirli bir çekiciliğe sahiptir ve bu nedenle larvalar MSS'ye yerleşmektedir (18). Yumurta ile enfekte olunduktan 6-8 ay sonra yaklaşık 5 cm çapında, içi yarı saydam sıvı ile dolu, iç kist duvarından yaklaşık 400-500 protoskoleks oluşturabilen ve güçlü bir aseksüel üreme yeteneğine sahip coenurus kistlerinin meydana geldiği bilinmektedir (19).



Şekil 1. *Taenia multiceps*'in yaşam döngüsü.

Son konaklar, ara konakların enfekte organlarını yiyerek enfeksiyona yakalanmakta ve protoskolekslerden son konakların ince bağırsaklarında 40-60 gün sonra erişkin *T. multiceps* gelişmektedir (8). Erişkin parazitten yaklaşık 37.000 yumurta içeren günlük 3-4 gebe halka atılmaktadır (20). Heteroksen gelişim gösteren *T. multiceps*'in son konağın dışkılarıyla çıkan yumurtaları doğa koşullarına oldukça dayanıklıdır. Kuraklık şartlarına 15 gün, yüksek nem oranına karşı ise 30 gün boyunca direnç göstermektedir. Aynı zamanda yumurtalar yerdeki köpek dışkısında kış boyunca 60 günden daha fazla canlı kalabilmektedir (20, 21).

3.3. Coenurosis'in Epidemiyolojisi

Coenurosis ilk olarak 17. yüzyıl literatürlerinde incelenmiş, ancak daha eski belgeler incelendiğinde coenurosis benzeri klinik belirtilerin görüldüğü sinir sistemi hastalıklarının Hipokrat dönemine kadar dayandığı görülmektedir (17).

Enfeksiyon, ağırlıklı olarak meraya çıkarılan koyun ve keçiler ile çoban köpekleri arasında geçmektedir (22). Enfekte organların imha edilmesi konusundaki farkındalığın eksikliği de bu hastalığın yayılmasında oldukça önemli bir etkindir. Zaman zaman koyun ve keçiler arasında akut coenurosis salgınları meydana gelse de vakaların çoğu 1-2 yaş arasındaki hayvanlarda kronik enfeksiyonlar şeklinde seyretmektedir (17).

Coenurosis'den her yaş grubundaki hayvanlar etkilenebilse de 1-2 yaşındaki hayvanların daha hassas olduğu belirtilmiştir. Epidemiyolojisinde cinsiyet faktörünün de etkili olduğu ve dişilerin erkeklerden daha yüksek bir prevalans gösterdiği bildirilmiştir. Mevsim faktörünün ise prevalans üzerine etkisinin olmadığı ancak yağmurlu mevsimlerin enfekte dışkının otların üzerine yayılmasını kolaylaştırdığı için coenurosis oluşma riskinin artmasından sorumlu olabileceği belirtilmiştir (23). Koyun ve keçiler arasında koyunlar daha yüksek hassasiyet göstermektedir. Göçer hayvancılık yapılan sürülerde de enfeksiyon prevalansı daha yüksek oranda görülmektedir (17). Hastalığın prevalansı tarımsal iklim bölgelerinin varlığından, sosyolojik ve ekolojik faktörlerden de etkilenebilmektedir (14).

3.3.1.Coenurosis'in Dünya'daki Yaygınlığı

Coenurosis dünya çapında dağılım göstermektedir. Ancak Afrika ve Güneydoğu Asya'nın gelişmekte olan ülkelerinde daha yaygındır (14). Gelişmekte olan ülkelere koyun ve keçi yetiştiriciliği popüler bir gelir kaynağı olduğu için prevalansın daha fazla olduğu belirtilmiştir (14). Dahası çiftçiler, enfeksiyonun kötüleşmesi nedeniyle zarar görmekten kaçınarak karkas verimini sürdürmek için ilk coenurosis semptomları ortaya çıktığı anda hayvanları kesmeye eğilimlidirler. Bu durum da nispeten düşük çıkan coenurosis prevalanslarını açıklamaktadır (7).

Ürdün’de yapılan bir çalışmada bir yıl içerisinde kesimi yapılan koyunların kafaları incelenmiş, 451 koyun kafasının 12’si (%3) enfekte bulunmuştur (24). İran’ın kuzey batı bölgesinde yapılan bir çalışmada, her ay mezbahaneden alınan koyun kafaları incelenmiş ve 402 koyun kafasının 75’inin (%18,65) enfekte olduğu tespit edilmiştir (25). Yine İran’da yapılan başka bir çalışmada mezbahanede kesimi yapılan keçilerin 149’unun kafası incelenmiş, 22’sinin enfekte olduğu ve coenurosisin keçiler arasında %14,8 oranında yaygınlık gösterdiği belirtilmiştir (26). Başka bir çalışmada, İran’da incelenen 65 köpeğin 12’si *T. multiceps* ile enfekte bulunmuş ve etkenin prevalansı %18,5 olarak tespit edilmiştir (27). Orta Etiyopya’da 608 küçük ruminant (80 koyun ve 528 keçi) *C. cerebralis* açısından incelenmiş ve genel yaygınlık %23 olarak belirlenmiştir. Türlerle göre bu oran, keçilerde %3,9, koyunlarda ise %2,5 olarak tespit edilmiştir. Kasım ayının %8,1 yaygınlık oranı ile diğer çalışma aylarından daha yüksek bir prevalans gösterdiği kaydedilmiştir (28). Küçük ruminantlarda *C. cerebralis*’in yaygınlığını ve ekonomik etkisini değerlendirmek için Etiyopya’nın Bishoftu kasabasında yapılan bir çalışmada incelenen 384 koyunun 19’unda (%4,9) ve 384 keçinin 45’inde (%11,7) *C. cerebralis* kistleri gözlenmiştir (29). Bangladeş’te incelenen 750 keçi kafasının 39’unda (%5,2) kist saptanmıştır (30). Tanzanya’da yapılan bir çalışmada 90 koyun ve 90 keçi kafası incelenmiş, prevalans oranları sırasıyla %45,6 ve %43,3 olarak belirlenmiştir (31). Mısır’da incelenen 60 mezbahane materyalinde ise %18,3 prevalans oranı bildirilmiştir (32). Yine Mısır’da klinik belirtiler gösteren 420 koyunun kesimi takiben incelenmesi sonucunda 111’inin enfekte olduğu ve hastalığın %26,4 oranında yaygınlık gösterdiği bildirilmiştir (33). Hindistan’da yapılan bir çalışmada kesimi takiben incelenen 122 koyunda prevalans oranının

%12,3 olduğu bildirilmiştir (34). Sharma ve Chauhan (35)'nin bildirdiğine göre Irak'ta coenurosis prevalansı bir yaşlı koyunlarda %7,3 iken ortalama prevalans %3 olarak tespit edilmiştir. Oryan ve ark. (36), İran'da iki yıl boyunca inceledikleri 7992 koyunda %9,8 oranında coenurus kistleri bulunduğunu bildirmişlerdir. Etiyopya'da koyunlarda coenurosis epidemiyolojisi üzerine yapılan bir çalışmada klinik olarak belirti gösterenlerden 37 baş ve sağlıklı görünen koyunlardan 183 baş *C. cerebralis* larvalarının varlığı açısından incelenmiş ve bunların sırasıyla 37'si ve 5'i enfekte olarak kaydedilmiştir (37). Irak'ta koyunlarda *C. cerebralis* prevalansını belirlemek için yapılan bir çalışmada 36 koyun başı incelenmiş ve 31'inin (%22,8) enfekte olduğu bildirilmiştir (38). İtalya'da kesimi yapılan 566 koyunda %0,35'lik bir coenurus prevalansı gözlenmiştir (7).

3.3.2. Coenurosis'in Türkiye'deki Yaygınlığı

Coenurosisin Türkiye'de koyunlarındaki yaygınlığı ve oluşturduğu kayıplar tam olarak ortaya konulamamıştır. Uslu ve Güçlü (39)'nün bildirdiğine göre; Türkiye'de yapılan çalışmalarda coenurosisin yaygınlığı %1,3 ile %36,8 arasında değişmektedir. Pamukçu ve Ertürk, Ankara'da otopsis yapılan 627 köpeğin 169'unda helmint enfeksiyonlarına rastlamışlar ve bu hastalıklar arasında *T. multiceps* oranının %1,2 olduğunu belirtmişlerdir (40). Samsun yöresinde yapılan bir çalışmada 252 kuzu kesim sonrası helmint varlığı yönünden incelenmiş ve coenurosis olgusu %7,16 olarak belirlenmiştir (41). Konya ilinde yapılan bir çalışmada 624 koyun kafası incelenmiş, bunların 102'sinin (%16,35) *C. cerebralis* ile enfekte olduğu bildirilmiştir (39). Van'da yapılan bir çalışmada incelenen 241 koyunun 156'sı *C. cerebralis* yönünden pozitif bulunmuş ve %64,7'lik prevalans oranı bildirilmiştir (42). Kars ilinde kesilen 387 koyunda *C. cerebralis* prevalansı

12 ay boyunca araştırılmış ve coenurosis yaygınlık oranı %15,5 (60/387) olarak rapor edilmiştir. Yine Kars yöresinde klinik belirti gösteren ve nekropsisi yapılan 8 koyun, 6 dağ keçisi ve 3 sığırın hepsinde *C. cerebralis* kistlerine rastlanmıştır (43). Kırıkkale’de incelenen 100 koyunun 12’sinin (%12) beyinde *C. cerebralis* kisti belirlenmiş ve klinik olarak sağlıklı görünen koyunlarda bu oranın %11,1 olduğu bildirilmiştir. Erzurum ilindeki sığırlarda *C. cerebralis*’in prevalansını ve moleküler özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, 1045 sığır kafası incelenmiş ve 5’i (%0,47) enfekte bulunmuştur.

3.4. Coenurosis’in Zoonotik Önemi

Coenurosis sadece çiftlik hayvanları için değil aynı zamanda insan sağlığı için de potansiyel zoonotik bir risk oluşturmaktadır. İnsanlarda coenurosisin beyin formu oldukça ciddi belirtiler göstermektedir. Enfeksiyon ile semptomların ortaya çıkması arasında birkaç yıl geçebilmekte ve semptomlar coenurus kistinin lokalizasyonuna göre değişiklik gösterebilmektedir. Serebral coenurosis intrakraniyal hipertansiyon belirtileri ile kendini göstermekte ve hastalığın klinik ayırıcı tanısında nörosistiserkoz veya serebral hidatidozdan ayırt edilmesi oldukça zor olmaktadır. Gözlenebilecek diğer semptomlar arasında baş ağrısı, kusma, parapleji, hemipleji ve epileptik nöbet sayılabilmektedir (44). Bu hastalarda prognoz her zaman ciddidir ve yakın zamanda praziquantel veya albendazol tedavisi başlayana kadar tek tedavi seçeneği cerrahi yöntem ile kistin uzaklaştırılmasıdır (44).

İnsanlarda *C. cerebralis*, 1913 yılında Paris’te bir erkekte MSS dejenerasyonu semptomları görülünce teşhis edilmiş ve otopsi sırasında beyinde iki

adet coenurus kisti bulunmuştur (44). Son zamanlarda (son 25 yıl içinde), Uganda, Kenya, Gana, Güney Afrika, İtalya, İsrail, Kanada ve Amerika'da insan vakaları kaydedilmiştir (45-50). 1983 yılında ABD'deki dört yaşında bir kız hasta, nörolojik yeteneklerinin kötüleşmesiyle hastaneye başvurmuş, BT taraması yapıldığında beyinde sıvı dolu kistler dikkati çekmiştir. Operasyon sırasında yapılan incelemelerle coenurosis olgusu olarak teşhis koyulmuş ve yapılan tedavilere rağmen hasta bu hastalıktan dolayı hayatını kaybetmiştir (44). Günümüze kadar coenurosisin Türkiye'de insanlarda görüldüğüne dair herhangi bir kayıt bulunmamaktadır.

3.5. Coenurosis'in Ekonomik Önemi

Serebral coenurosis, özellikle koyun endüstrisi ve ıslahında ciddi sorunlara neden olduğu için ekonomik açıdan önemli bir hastalıktır (51). Gıcık ve ark. (52), coenurosisin Kars ilindeki genç koyunlarda koyun ölümlerine katkıda bulunan hastalıklardan biri olduğunu bildirmişlerdir. Miran (53), yaptığı bir anket çalışmasında, katılımcıların %58,8'inin koyunlarda, %47,9'unun ise keçilerde ölüm oranı bakımından en önemli hastalıklar sıralamasında coenurosis seçtiklerini belirtmiştir. Aynı zamanda serebral coenurosis kaynaklı doğrudan kayıplar arasında klinik belirtiler başladığında hayvanların kesilmesi ve aniden elden çıkarmalar olduğu belirtilmiştir. Yapılan anket çalışmasında son bir yılda hasta keçilerini satan katılımcılardan %66,7'si keçilerini coenurosis nedeniyle sattıklarını belirtmişlerdir. Yine katılımcıların dikkat çekici yanıtlarından bir tanesi de hastalık sonrası iyileşen hayvanlarının olmaması ve kesimi tercih etmeleri olmuştur. Coenurosis klinik vakalarında, ankete katılanların % 23,1'i hayvanlarını evde kestiğini, %4,1'i canlı

hayvanlarını sattığını, %72,2'si ise hayvanlarını daha ucuz fiyata sattığını belirtmişlerdir.

Etiyopya'da, Deressa ve ark. (54), coenurosis nedenli beyin imhaları sonucunda yıllık zararın 490 USD olduğunu belirtmişlerdir (54). Etiyopya'da yapılan başka bir çalışmada, 2014 yılında Legahida bölgesinde coenurosis kaynaklı ölümlerin sebep olduğu ekonomik kayıpların 398,250 ETB (19.432,61 USD) olduğu tahmin edilirken, 50 klinik olarak hasta hayvanın estetik değerinden kaynaklanan ortalama parasal kayıpların yaklaşık 17,500 ETB olarak; tedavi arayışı nedeniyle ücret kaybı, tedavi maliyetlerinden kaynaklanan kayıplar ve zayıf karkas ağırlığından dolayı şekillenen kayıplar ise sırasıyla 1250, 3120 ve 65.318,4 ETB olarak hesaplanmıştır. Bu ekonomik kaybın Legahida bölgesinde yıllık 485.438,4 ETB (23.679,92 USD) tutarında olduğu, bu nedenle, etkili kontrol önlemleri alınması gerektiği ifade edilmiştir (55). Yine Etiyopya'da yapılan bir araştırmaya göre beyin imhasına bağlı toplam yıllık mali kayıp 18.127,2 USD (335.353,2 ETB) olarak tahmin edilmiştir. Bu verilerden hareketle, küçükbaş hayvanlarda en önemli paraziter hastalıklardan biri olan coenurosisin hem ulusal düzeyde hem de dünya genelinde büyük ekonomik kayıplara yol açtığı ve bu nedenle uygun kontrol önlemlerinin alınması gerektiği rapor edilmiştir (29).

3.6. Coenurosis'in Klinik ve Patolojik Bulguları

Coenurosis'in klinik bulguları beyin ve omurilikteki *C. cerebralis* kistinin yeri ve büyüklüğü ile ilişkilidir (56). Etkilenen hayvanlarda kendi etrafında dönme, ataksi, kafa sapması ve körlük gibi nörolojik belirtiler ortaya çıkmaktadır (44). Akut form, MSS'deki onkosferin göçü neticesinde oluşmakta ve klinik belirtiler ile akut

formun derecesi arakonak tarafından alınan yumurta sayısı, yangısal yanıt, bağışıklık tepkilerinin yoğunluğu ve parazitin lokalizasyonuna bağlı olarak değişmektedir (37). Onkosfer, konak immün yanıtı tarafından yok edilirse, klinik iyileşmenin tamamlandığı belirtilmiş ve böyle bir durumda, otopsi sırasında sadece küçük kazeöz lezyonların bulunduğu söylenmiştir (57).

Kronik coenurosis, genellikle bir serebral yarıküreyi içeren, beynin yavaş ilerleyen fokal lezyonu olarak ortaya çıkmakta ve 6-18 aylık koyunlarda daha sık görülmekte, üç yaşından büyük koyunlarda ise nadiren şekillendiği bildirilmektedir (58).

Coenurosis'in akut fazı sırasında, beynin yüzeyinde, beyin sapı ve serebellumun kesitlerinde soluk sarı alanlar görülmektedir. Mikroskopik incelemede, göç yolları hemorajik ve lökosit infiltrasyonu ile çevrelenmiş nekrotik dokular dikkati çekmektedir. Eozinofiller ve yabancı cisim dev hücrelerinin, bu yolları çevreleyen inflamatuvar reaksiyonda baskın oldukları bildirilmiştir. Kronik coenurosisde, kistin hacminin büyümesiyle artan intrakraniyal basınç, beyin dokusunu sıkıştırmakta ve kafatasının bir bölgesinin yumuşamasına yol açabilmektedir. Artan intrakraniyal basınç, serebellumun foramen magnumdan veya serebrumun tentoryumun altından fıtıklaşmasına neden olabilmektedir. Tek taraflı serebral hemisferde bir kistin varlığı kontralateral gözde palpebral refleks kaybına neden olmakta, böylece sağ gözdeki körlük, lezyonun sol yarımkürede olduğunu göstermektedir. Kistin vestibüler veya serebello-vestibüler yolaklarda bulunması halinde, etkilenen tarafa doğru bir kafa eğimi ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca klinik durumun bozulması, serebellar kist olgularında daha hızlı gerçekleşmektedir (58).

Artan kist hacmine karşın, parazitin metabolik süreci ve nörodejeneratif proteinlerinden kaynaklanan atıklar ile meydana gelen sinir sistemi toksisitesi koyun MSS coenurosisindeki klinik bulguların nedenleri arasındadır (59). Kistin büyümesi için coenurus kist duvarı ve konakçı beyni arasında glikoz, aminoasitler, lipitler ve diğeryateryaller de dâhil olmak üzere besinlerin değışimi gerekmektedir. Bu proseslerde görev alan glutamat, sadece metabolik enerji sağılamakla kalmaz, aynı zamanda sinapslar ve nöronlar arasındaki sinyal iletimlerini düzenleyen bir nörotransmitter olarak da görev yapar (60, 61). Memeli konakçıdan besin elde etmenin yanı sıra, parazitin larval döneminde nörotoksik maddelerin üretimi ve salınması neticesinde nörolojik disfonksiyonların meydana geldiğı belirtilmektedir. Metabolizma sırasında, protoskoleks tarafından glikoz ve oksijen tüketimi, kist duvarının dışına salınan karbondioksit üretimi ile sonuçlanmakta ve bu da konakçı hücre toksisitesine neden olmaktadır. Ek olarak, protoskolekslerde yüksek sodyum/potasyum taşıyan ATPaz ve kalsiyum pompası ekspresyonu da vardır ve bu, konak nöronlarının çevresindeki iyon homeostazisini etkileyebilmektedir. Sinapslar üzerinde yayılan glutamatın dengesizliğinin, sinaptik fonksiyonu değıştirebildiğı ve konaklarda sinirsel iletim sisteminde toksisiteye neden olarak sinyal iletimini engelleyebildiğı gösterilmiştir (58). Bu veriler ışığında meydana gelen klinik ve patolojik bulguların sadece kistin artan hacmiyle ilgili olmadığı aynı zamanda sinirsel toksisitenin de rolünün büyük olduğı ortaya konulmuştur (62).

3.7. Coenurosis'in Teşhisi

Hastalığın teşhisi, klinik görünüm, nörolojik muayene, nekropsi ve ölüm sonrası muayeneye dayanmaktadır. Her ne kadar kist yerleşimi ile klinik belirti uyumu bazen yanıltıcı olsa da klinik belirtilerin yorumlanması halen en iyi tanı yöntemidir. Coenurosis genellikle klinik muayene protokolüne dayanarak teşhis edilir ve bunun yanında Ultrasonografi (USG) ve Bilgisayarlı Tomografi (BT) gibi görüntüleme yöntemleri de kullanılabilir (44). Yapılan bir çalışmada dokuz koyun ve üç keçi USG ile muayene edilmiş ve sadece bir hayvanda kist görülebilmiştir. Bu çalışma sonucunda US'nin koyun ve keçilerdeki kronik coenurosis için uygun maliyetli, kolay ve etkili bir tanı aracı olduğu sonucuna varılmıştır (63). Gazioğlu ve ark (64) ise BT tarama görüntüleme yoluyla coenurosisin teşhisini yapmayı amaçlamış ve doğal enfekte hayvanlarda coenurosis teşhisinde ilk kez BT'yi kullanmışlardır. Toplam 60 buzağı ve 80 koyun klinik olarak incelenmiş ve bunlardan dört koyun ve bir buzağıya nekropsi yapıldığında *C. serebralis* kistleri tespit edilmiştir. İncelenen hayvanlardan bir koyunda CT taramasıyla sağ serebellar hemisferde bir kist tespit edilmiştir (64).

Teşhise yönelik kullanılan görüntüleme yöntemlerinin dışında, aşırı duyarlılık deri testi, indirekt hemagglütinasyon antikor testi, immunoelektroforez, jel-double difüzyon ve ELISA testleri de deneysel olarak kullanılmıştır (44). Birtakım uygulama zorlukları olan bu testlerin mevcudiyetine rağmen, kesin tanı için nekropside beyindeki kistin görülmesi önerilmiştir (26).

Moleküler yöntemler türlerin teyid edilmesi amacıyla kullanılmış, doğal ve deneysel enfekte koyun ve keçilerdeki serebral kistlerin mitokondrial CO1 ve

NAD1 gen bölgelerinin PZR ile amplifiye edilmesi ve sekans analizi, köpeklerden elde edilen erişkin *T. multiceps* sekans sonuçları ile %100'e yakın benzer bulunmuştur (16).

Wang ve ark. (65) tarafından, köpek dışkısında *T. multiceps* yumurtalarını tespit etmek için direkt-PZR yöntemi geliştirilmiştir. Klasik-PZR ile direkt-PZR yöntemini karşılaştırılmış, klasik PZR ile %78,6 pozitif sonuç alınırken, dizayn edilen direkt-PZR yöntemi ile %85,7 oranında pozitiflik elde edilmiştir.

Taenia multiceps'in moleküler karakterizasyonu ilk olarak koyunlarda Varsacia ve ark. (66) tarafından CO1 ve NAD1 mitokondriyal genleri kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışma ile *T. multiceps* genetik çeşitliliğinin %0,22 ile %0,67 arasında değiştiği ve üç farklı varyant (Tm1, Tm2 ve Tm3) olduğu bildirilmiştir. Varcasia ve ark. (67), başka bir çalışmalarında sığır ve küçük ruminantlardan izole ettikleri *C. cerebralis* kistlerinin CO1 ve NAD1 genlerini kullanarak genetik değişkenliğini incelemiş ve Tm1 varyantına ait 10 haplotip bulunduğunu ortaya koymuşlardır.

Türkiye'de yapılan bir çalışmada, enfekte 20 koyundan elde edilen *T. multiceps* izolatlarının mt-CO1 gen bölgesi PZR ile çoğaltılıp sekans analizi yaptırıldıktan sonra filogenetik analize tabi tutulmuştur. Sonuçta, analiz edilen *T. multiceps* örneklerinde BC3, BC10 ve BC11 adı verilen üç farklı varyant tespit edildiği bildirilmiştir (68).

Hindistan'da keçilerde coenurosisin visceral ve serebral olmak üzere iki farklı formundan izole edilen izolatların CO1 ve NAD1 gen bölgeleri kullanılarak

patolojisi ve moleküler karakterizasyonu karşılaştırılmış ve filogenideki olası farklılıkların patolojiyle bağlantılı olabileceği bildirilmiştir (69).

Coenurosis'i saptamak için ham antijen (0,85 mg/ml) kullanılarak dot immunogold filtration assay (DIGFA) ile teşhisi denenmiş ancak spesifite-sensitivite değerleri açısından iyi sonuçlar alınamamıştır (70). Tanısal antijen olarak ham antijenlerin kullanılması, seri üretim aşamasına dengesiz termal stabilite gösterdikleri için ham antijen kullanılan çalışmalar çok ileri gidememiştir. Sonuç olarak, rekombinant antijenlere dayanan ELISA deneylerine yönelim artmış, bu hastalığı teşhis etmek için giderek daha fazla kullanılmaya başlanmıştır. Rekombinant proteinlerden Tm-P2, Tm-HSP70, Tm-GP50, Tm-GST ve Tm-HSP60, güvenilir ELISA metodları oluşturmak için teşhis antijenleri olarak kullanılmıştır (71-74).

Coenurosis'in erken dönem serodiyagnozu amacıyla yapılan bir çalışmada, *T. multiceps*'in transkriptomundan GP50'yi (TmGP50) kodlayan bir cDNA tanımlanmış, klonlanmış ve *E. coli*'de eksprese edilmiştir. TmGP50 temelli indirekt-ELISA sonuçlarına göre, protein %95 sensitivite ve %92,6 spesifite sergilemiştir. Deneysel olarak *T. multiceps* ile enfekte olan keçilerde TmGP50 antikoru 2 ila 17 hafta arasında tespit edilirken, kontrol grubunda ise antikorun praziquantel tedavisinden yaklaşık üç hafta sonra eşik değerin altına düştüğü gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonucunda rekombinant TmGP50'nin keçilerde coenurosis için uygun bir erken tanı antijeni olduğu ifade edilmiştir (72).

Yapılan başka bir çalışmada *T. multiceps*'in antijen B (AgB) ve tioredoksin peroksidaz (TPx) genleri klonlanmış ve serodiyagnostik potansiyelleri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre rTm-AgB'nin %95,8'lik bir

sensitivite ve %87,5'lik bir spesifite gösterdiği ve *T. multiceps*'lerin serolojik teşhisi için güçlü potansiyelinin olabileceği ifade edilmiştir (71).

Taenia multiceps'in transkriptomundan laktat dehidrojenaz A (Tm-LDHA) ve B'yi (Tm-LDHB) kodlayan gen bölgesi izole edilip, rekombinant Tm-LDHB (rTm-LDHB) elde edilmiştir. Rekombinant Tm-LDHB'nin immünojenitesinin belirlenmesinden sonra, keçilerde rTm-LDHB'nin serolojik tanısal potansiyelinin değerlendirilmesi için geliştirilen rTm-LDHB bazlı ELISA'da, *T. multiceps* ile enfekte edilen keçilerin saptanmasındaki spesifite oranı %71,42 (10/14) olmuştur. Bu sonuçlar neticesinde rTm-LDHB'nin keçilerdeki *T. multiceps* enfeksiyonunun immünodiyagnozu için spesifik bir antijen adayı olmadığı belirtilmiştir (73). Tanısal amaçlı yapılan bir diğer çalışmada, *C. cerebralis*'in total RNA'sından glutatyon S-transferaz (GST) geni amplifiye edilip, rekombinant Tm-GST (rTm-GST) proteini eksprese edilmiş ve rekombinant protein, serumda anti-GST antikorlarının saptanmasında %92,8 (13/14) ve %90 (18/20) duyarlılık göstermiştir. Çalışmada Tm-GST'nin coenurosis için bir teşhis antijeni olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir (74).

3.8. Coenurosis'in Tedavisi

Coenurosisin tedavisi son konaklarda erişkin parazitlere, arakonaklarda ise larva formuna karşı çeşitli tedavi uygulamalarını içermektedir. Son konak enfeksiyonlarının sağaltımı, hastalığın insanlara bulaşmasının önlenmesi açısından da kritiktir. Ara konaklarda, tanıdaki güçlükler ve yetiştiriciler tarafından tedavi protokollerinin başarılı olmadığından dolayı tedavi çok tercih

edilmemektedir. Tedavide asıl önemli aşama son konakların tedavi edilmesi ve ara konakların kistli organlara ulaşmalarının engellenmesidir (75).

Bıyıkoglu ve Doğanay (76) tarafından yapılan bir çalışmada, kuzularda deneysel olarak oluşturulan *C. cerebralis*'e karşı praziquantel ve albendazol'un etkisini araştırmak amacıyla 21 Akkaraman kuzu *T. multiceps* yumurtaları (ortalama 5500 yumurta) ile enfekte edilmiş ve kuzular yedişerli gruplara ayrılmıştır. Deneme gruplarına ilaç uygulamasına kronik coenurosis belirtilerinin görüldüğü ilk gün başlanmıştır. Birinci gruba üç gün süre ile 25 mg/kg dozda praziquantel, ikinci gruba da 14 gün süre ile 10 mg/kg dozda albendazol verilmiştir. Üçüncü grup kontrol olarak tutulmuştur. Birinci grupta dört kuzu, ikinci grupta da üç kuzu öngörülen nekropsi tarihine kadar yaşamlarını sürdürebilmiş, diğerleri ise daha önce ölmüştür. Her iki gruptan ikişer kuzuda nekropsi gününe kadar klinik iyileşme görülmüştür. Praziquantel uygulanan grupta belirlenen 35 kistten 21'inin (%60) dejenere, 14'ünün (%40) ölü; albendazol uygulanan grupta belirlenen 42 kistten 10'unun (%23,80) dejenere, 13'ünün (%30,95) ölü, 19'unun (%45,23) da canlı olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda ise 35 kistten 34'ünün (%97,14) canlı, birinin (%2,85) ise kazeifiye olduğu belirlenmiştir. Her iki ilaç grubundaki hayvanlardan elde edilen protoskoleksler iki ayrı köpeğe verilmiş ve bu köpeklerde erişkin cestod gelişmemiştir.

Benzer bir çalışma Ghazaei (77) tarafından yapılmış, 25 adet kuzu beş gruba ayrılmış ve her birine yaklaşık 6500 adet *T. multiceps* yumurtası verilmiştir. İlaç uygulamasına dört tedavi grubunun hepsinde semptomların ortaya çıkışının ilk gününde başlanmıştır. Birinci gruba sadece 25 mg/kg dozda albendazol, 2. gruba sadece 25 mg/kg dozda fenbendazol, 3. gruba sadece 25 mg/kg dozda praziquantel,

4. gruba ise 100 mg/kg dozda praziquantel+fenbendazol kombinasyonu verilmiştir. Yapılan çalışmanın sonucunda en iyi sonuç, 25 mg/kg dozunda albendazol ve 100 mg/kg dozda fenbendazol + praziquantel kullanılarak elde edilmiştir.

Afonso ve ark. (26) tarafından yapılan deneysel bir çalışmada ise albendazol 10 mg/kg dozda üç gün süre ile enfekte gruplara uygulanmış ve belirtilerin başlamasından iki ay sonraki enfeksiyonlarda başarılı olduğu bildirilmiştir. Ancak hastalığın meydana gelişinden beş ay sonra ilacın etkinliğinin %88,6'ya düştüğü ve bu oranın tedavi uygulanmayan kontrol grubu ile yakın olduğu belirtilmiştir.

Bu hastalığa uygulanan en etkili tedavinin, hayvanın genel anestezisi altında kistlerin cerrahi olarak çıkarılması yaklaşımı olduğu ve özellikle lezyon doğru bir şekilde çıkarıldığında, çok iyi bir başarı oranına sahip olduğu belirtilmiştir (58). Operasyon sonrasında sekonder kistlerin yayılmasını önlemek için albendazol'un tek başına veya praziquantel ile kombinasyonunun birlikte kullanılması, olumlu sonuçlar ortaya koymuştur (77). Cerrahi tedavi çok zor bir operasyonu gerektirmekte olup, ancak insanlarda ve nadiren damızlık değeri çok yüksek olan hayvanlarda önerilebilmektedir. Bu nedenle en etkili yöntem mera, sürü ve köpek üçgeninde uygulanacak kontrol yöntemlerinin hayata geçirilmesidir (44).

3.9. Coenurosis'te Koruma ve Kontrol

Hayvancılıkta coenurosisin kontrolü, diğer taeniid sestodları önlemek için kullanılan önlemlerle benzerlik göstermektedir (51). Serebral coenurosis, köpeklerin 6-8 haftalık aralıklarla düzenli anthelmintik ilaçlarla tedavi edilmesi ile hayvanların kesilmesi veya ölümünden sonra koyun ve keçi beyninin doğru şekilde

imha edilmesi ile önlenebilmektedir (58). Etkili kontrol önlemleri arasında, enfekte hayvanların evlerin bahçesinde kesilerek enfekte organların hayvanlara yedirilmesinin engellenmesi, enfekte kafaların imha edilmesi ve halkın bu konuda bilinçlendirilmesi gibi yöntemlerdir (52). Aynı zamanda epidemiyolojide önemli bir nokta olan enfekte sularla ilgili, insan enfeksiyonlarına karşı su kaynaklarının kontaminasyonuna dikkat edilmeli, tüm meyve ve sebzeler iyice yıkandıktan sonra tüketilmelidir (44). Bunların yanında coenurosis'e karşı kemoprofilaktik amaçlı çalışmalar da yapılmıştır. Sürülerde, fenbendazol'un enfeksiyonu %16'dan %0,2'ye geriletği, yine fenbendazol ile birlikte praziquantel kullanımının kistlerin gelişimine engel olduğu tespit edilmiştir (78).

Vahşi yaşam, genişleyen kentsel ve tarımsal alanlar ve insanların hobileri için doğal yaşam alanlarını tercih etmeleri nedeniyle birçok tür için tehdit oluşturmaktadır. Bununla birlikte, kıvrıl tilki, çakal ve rakun gibi bazı etoburlar ise bu döngüden faydalanarak popülasyonlarını artırmaktadırlar. Sonuç olarak, kentleşme genellikle çok farklı ekolojilere sahip arakonak ve sonkonak türleri içeren parazitlerin bulaşma riskini artırmaktadır. Bu nedenle yaban hayatı ve kentsel hayatın kontrollü bir şekilde devam etmesi için parazit enfeksiyonlara karşı da önlem alınmalıdır (79).

3.10. Coenurosis'te İmmünite

Sestodlar, diğer helmintler gibi konaklarına çok iyi adapte olmuş zorunlu parazitler olup, konak immun yanıtından kaçma stratejileri oldukça gelişmiştir. (80). Sestod enfeksiyonlarında bağışıklık sistemi hücrelerinden özellikle CD4+ yüzey reseptörünü taşıyan ve yardımcı T lenfositleri olarak bilinen hücreler konağın

savunma mekanizmasında öncelikli olarak yer almaktadır. İmmünolojik olaylarda lenfosit ve makrofajlardan sitokin ve interlökinler salgılanmakta, T ve B hücreleri tarafından salgılanan bu sitokinlere lenfokinler adı verilmektedir. Sitokinler lökositlerin gelişmelerini, hareketlerini ve farklılaşmalarını sağlayarak etki göstermektedir. Interlökin-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, tümör nekroz faktörü (TNF) ve interferon (IFN)'lar sitokinlerin başlıcalarıdır. Th hücreleri aldıkları uyarıların tipine bağlı olarak değişik sitokinleri salgılayan alt gruplara ayrılmaktadır. IL-2, IFN- γ ve lenfosit salgılayan Th1 hücreleri konağın savunma sistemini güçlendirirken, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 sentezleyen Th2 hücreleri konağı enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale getirmektedirler. Uzun yıllar boyunca, erişkin sestodlar ile bağırsak enfeksiyonunun son konakta immünolojik tepkilere neden olmayacağı düşünülmüş ve bunun doğru olmadığı yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır. Deneysel ve doğal enfeksiyonlardan elde edilen kanıtlar, spesifik antikor tepkilerinin meydana geldiğini ve immünolojik olarak aracılık edilen efektör mekanizmalarının bağırsaktaki konak-parazit etkileşiminin sonucuna katkıda bulunduğunu göstermiştir (81).

Taeniid sestodların koruyucu bağışıklık tepkileri, parazitlerin ara konakçılarında kolayca gösterilebilmesi açısından helmint parazitleri arasında benzersizdir. Lightowers (82)'ın belirttiği üzere, taeniid sestodlara karşı koruyucu bağışıklık tepkilerinin doğası hakkında artık çok şey anlaşılmıştır. Ancak taeniid sestodlara karşı koruyucu bağışıklık tepkilerinin doğası hakkında çok şey anlaşılmış olsa da birçok yönün hala açıklığa kavuşturulması gerekmekte ve doğru bilinen verileri doğrulamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu ifade edilmektedir.

3.11. Coenurosis'te Aşı Çalışmaları ve Aşı Adayı Proteinler

Sestod enfeksiyonlarının immunobiyojisi konusunda yapılan çalışmalar bu parazitlere karşı pratik olarak kullanılabilecek aşılarda geliştirilebileceğini göstermektedir (69).

Gauci ve ark. (83) tarafından yapılan bir çalışmada *Taenia ovis* ve diğer *Taenia* türlerinde bulunan rekombinant onkosfer antijenlerinin homologları, *T. multiceps*'te de tanımlanmış ve *T. multiceps* onkosfer proteinleri, Tm16 ve Tm18 olarak adlandırılmıştır. Rekombinant Tm16 ve Tm18 proteinleri, başarıyla eksprese edilmiş ve Quil A adjuvanı ile formüle edilmiş antijenler, koyunlarda yapılan bir aşı denemesinde test edilmiştir. Antijenlerin, koyunlarda, *T. multiceps* yumurtalarına karşı bağışıklığı uyardığı belirtilmiştir. Dokuz adet koyun kontrol grubu olarak belirlenmiş, bunlardan beşi deneysel enfeksiyon nedeniyle ölürken 20 adet aşılanan koyunda ölüm gözlenmediği bildirilmiştir. Belirtilen rekombinant onkosfer antijenlerinin koyunlarda *T. multiceps* enfeksiyonuna karşı etkili aşılama stratejilerinin geliştirilmesine imkân sağlayacağı ve ayrıca *E. granulosus* EG95 antijeni ile kombine bir aşının geliştirilmesi ve aynı zamanda kistik hidatik hastalığının bulaşmasını önleme potansiyeline de sahip olabileceği belirtilmiştir.

Oncosphere Secretory Antigen (OSA)'in koyunları *T. multiceps* larva evresine karşı korumadaki etkinliğini araştırmak için yapılan bir çalışmada, 5000 *T. multiceps* yumurtası ile deneysel enfekte edilmiş 30 koyun OSA ile tedavi edilmiş, 11 koyun da kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Nekropside 30 hayvanın beşinde (%16,6) coenurosis veya dejenere lezyonlar mevcutken, tedavi edilmeyen 11 hayvanın 8'inde (%72,7) beyinde serebral coenurosis veya dejenere lezyonlar

olduğu ve OSA'nın hayvanları serebral coenuriasise karşı korumak için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (84).

Taenia multiceps enolaz geninin klonlanmasıyla elde edilen rTmENO proteinin, plazminojen bağlama özellikleri gösterdiği belirtilmiş ve hem kist sıvısında hem erişkin parazitlerde hem de larval dönemde western blot analizi ile tanımlanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda TmENO proteininin *T. multiceps* için yeni kontrol stratejilerinde kullanılabileceği belirtilmiştir (85). Başka bir çalışmada Fatty Acid Binding Protein (FABP)'in klonlanması ve moleküler karakterizasyonunun belirlenmesiyle TmFABP'ın (14 kDa) *T. multiceps*'i önlemek için bir aşı adayı protein olabileceği ileri sürölmüştür (86).

3.12. Heat Shock Protein (HSP)'ler

Heat Shock Protein familyaları çeşitli taksonlarda birçok organizmada evrimsel olarak korunmuş (87) ve ilk olarak 1962'de *Drosophila*'da keşfedilmiştir (88). Bunlar, proteinlerin yanlış katlanma ve kümeleşmesini önlemenin yanısıra hücresel fonksiyonları korumaya yardımcı önemli moleküler şaperonlardır (89, 90). Hücreler ısı şoku, alkali muamele ve bazı kimyasal reaktifler gibi stres koşulları altında kültüre edildiğinde ekspresyon seviyeleri önemli ölçüde artmaktadır (91). Geçtiğimiz birkaç yıl içinde, bir dizi araştırma, HSP'lerin yalnızca protein modifikasyonuna ve katlanmasına dâhil olmadıklarını, aynı zamanda birçok sinyal yoluna katıldıklarını göstermiştir (92). Ayrıca, HSP'ler antijen işleme sırasında bağlanma antijeni gibi bağışıklık sistemini etkileyerek sitokin salınımını da indöklemektedir (93).

Heat Shock Protein (HSP)'ler, moleküler ağırlıklarına göre HSP90, HSP70, HSP60 ve küçük HSP'leri (15-30 kDa) içeren HSP27 olmak üzere dört ana ailede gruplandırılmaktadır. Bunlar ya yapısal olarak (HSP90 β) ya da indüktif (HSP90 α) olarak ifade edilir ve farklı hücre-içi kompartmanlarda bulunurlar. En çok çalışılan HSP'ler HSP90, HSP70 ve HSP27.1'dir (94).

Stres proteinlerinin pek çok patojende majör antijen olduğu ve ökaryot hücrelerde enfeksiyonu takiben çeşitli stres proteinlerinin arttığı bildirilmiştir. Konağın patojene uyguladığı stres, patojende stres proteinlerinin yapımını arttırmakta ve muhtemelen miktarları arttığında, immün cevabı tetikleyen başlıca antijen konumuna geçmektedirler. Bu nedenle pek çok helmint, protozoa ve bakteri enfeksiyonunda HSP70 ve HSP60'lara karşı antikorlar gösterilmiştir (95).

HSP'ler, yüksek miktarlarda eksprese olan çok sayıda protein içermektedir ve hücre stres koşullarına maruz kaldığında ekspresyon seviyeleri artmaktadır (96). HSP'lerin organizmada önemli rolleri olduğu, çevresel stres faktörlerine cevap verdiği ve bazı genlerin açılıp kapanmasıyla karakterize olduğu gösterilmiştir (97). HSP'ler aynı zamanda işlevsel olarak proteinlerin ligandları bağlamasına, kofaktörlerle etkileşime girmesine veya biyolojik fonksiyonları yerine getirmesine olanak veren konformasyonel olgunlaşmayı uyarmaktadırlar (98).

Parazitler, konak organizmalarda hayatta kalmak zorundadırlar ve bazılarının yaşam döngüsünü tamamlamak için ara konakçılara ihtiyacı vardır. Konakçılar parazitler için farklı ortamlar sunarlar; bu nedenle hayatta kalmak için adaptasyon önlemleri almaları gerekmektedir (99). Konakçının sunduğu bu ortamlar dışında, konakçı bağışıklık sistemindeki sıcaklık, pH ve iyon değişiklikleri büyük strese neden olabilir. Bazı parazitler bu değişimlere uyum sağlamak ve

çoğalmak için büyük miktarlarda HSP'ler eksprese ederler (100, 101). Bu da HSP'lerin paraziter hastalıklara karşı potansiyel olarak ilaç hedefleri olmasını sağlar (102). HSP'ler son yıllarda önemli bir antikanser hedefler haline gelmesine rağmen, onları paraziter hastalıklar için hedef alan araştırmalar sınırlıdır (99, 103). Bu durum, proteinin yüksek korunmuş bölge olmasından ve belirli bir organizmanın HSP'sine özgü bir inhibitörün geliştirilmesinin zor olduğu görüşünden kaynaklanmaktadır (103).

Son zamanlarda HSP'ler, aşı üretiminde antijen olarak genetik mühendisliğinde ve bazı parazitlerin tanısında ve tanımlanmasında kullanılmıştır (104).

HSP70, evrimde açık ara en çok korunan protein olup bakterilerden bitkilere ve insanlara kadar tüm organizmalarda bulunmaktadır (105-107). Bu nedenle de HSP70 proteinleri birbirleriyle yaklaşık %50 oranında aminoasit özdeşliği göstermekte ve moleküler evrim alanında oldukça takdir gören bir filogenetik aday olarak gösterilmektedir (108). En uzaktan ilişkili türlerin HSP70'leri arasındaki yüksek derecede benzerlik, bu proteinlerin evrimindeki kısıtlamaları gösterir. Sitoplazma ve endoplazmik retikulumda lokalize olan ökaryotik HSP70'ler, prokaryotlardan ve prokaryotik kökenli organellerden gelen HSP70'ler ile yaklaşık %50 benzerlik gösterir (109). Bu durum hayvanlar ile mantarlar âlemi arasındaki HSP70 genlerine ait filogenetik ilişkileri ve %91 oranındaki benzerliği de açıklamaktadır (108). HSP70'ler yüksek oranda korunur ve ökaryotik hücreler arasında %60-78 oranında nükleotid benzerliği varken ökaryotik HSP70 ile *E. coli* DNA'sı arasında %40-60 arasında bir benzerlik mevcuttur (110). HSP70, hücrede ısı stresi tarafından indüklenen HSP70 ve soydaşı Heat Shock Cognate 70 olmak

üzere iki çeşit protein ailesi olarak bulunmakta olup sitoplazmada iki temel formu görülmektedir. HSP70 olarak bilinen HSP72 stres durumunda artarken, HSP73 sürekli üretilmektedir. Yine bu aile içinde yer alan HSP75 mitokondride, HSP78 endoplazmik retikulum'da bulunmaktadır (111, 112). HSP70 proteinleri parazitler arasında da filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Örneğin *Cryptosporidium* türleri arasında HSP70 geninin nükleotid sekansları belirlenmiş ve filogenetik analizin sonuçları, *Cryptosporidium* cinsinde genetik olarak farklı birkaç türün ve *C. parvum* türü içinde sekiz farklı genotipin varlığını ortaya koymuştur (113). Benzer bir çalışma enfekte köpeklerden izole edilen *Babesia gibsoni*, *B. canis canis*, *B. canis vogeli* ve *B. canis rossi*'nin HSP70 genlerinin nükleotid ve aminoasit dizilerinin filogenetik ilişkisinin ortaya konması için araştırılmış ve HSP70 geninin nükleotid sekanslarının, 18S nükleer alt birim ribozomal DNA'dan (18S rDNA) daha fazla çeşitliliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (114). Yapılan başka bir çalışma, 70 kDa'luk *Toxoplasma gondii* HSP70 proteinin immünomodülasyon yoluyla paraziti konağın etkilerinden koruduğunu göstermiştir (115). *Trypanosoma cruzi* HSP70'inin kemik iliği öncü hücrelerinden üretilen murin dendritik hücrelerinin (DC) olgunlaşması üzerindeki etkisi analiz edilmiş ve HSP70 fragmanının murin DC'yi olgunlaştırdığı belirlenmiştir. Olgun DC ise IL12, TNF α sitokinler, kostimülasyon molekülleri ve aktivasyon belirteçlerinin ekspresyonunu artırmıştır. Bu bulgular sonucunda, *T. cruzi* HSP70'in DC tabanlı immünoprofilaksi ve enfeksiyonlara karşı tedavi geliştirmek için çok yararlı bir araç olabileceği belirtilmiştir (116).

Colebrook ve Lightowlers (117), *E. granulosus* HSP70 (EgHSP70) ile reaktif spesifik antikorlarının hidatik kist hastalarının %60'ında, sağlıklı kontrol

donörlerinin ise sadece %20'sinde bulunduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle, konakçı-patojen etkileşimlerinde, patojenlere ait stres proteinlerinin immünolojik olarak önemli rol oynayabileceği söylenebilmektedir (117). Çin'de yapılan bir çalışmada keçilerden elde edilen *C. cerebralis* kistinde HSP70 gen bölgesi eksprese edilmiş ve ELISA'daki kullanılabilirliğine bakılmıştır. Araştırmacılar sadece üç pozitif keçi serumu ile sensitivite değeri hesaplamaya çalışmışlar, bunun yanı sıra %83,3'lük spesifite değeri elde etmişlerdir (118).

Yapılan başka bir çalışmada ise TmHSP60 ve TmHSP-36'nın dizi, yapısal ve fonksiyonel analizleri, *T. multiceps*'in moleküler şaperonlar olarak yaşam döngüsünde önemli rol oynayabileceğini göstermiştir. Tm-HSP60, Tm-p36'ya kıyasla daha güçlü immünojenik karakter sergilemiş ve antikor saptama potansiyeline sahip olduğu ileri sürülmüştür. Tm-p36 ise onkosferlerin aktivasyonu ile güçlü bir şekilde ilişkili bulunmuş ve aşılama için potansiyelinin olduğu belirtilmiştir. Ancak, Tm-p36 ile karşılaştırıldığında, Tm-HSP60 daha güçlü immünojenik aktivite sergilemiş ve rTm-HSP60'a dayanan indirekt ELISA sonucunda, %83,3'lük bir sensitivite ve %87,5'lik bir spesifite sergilerken, rTm-p36 indirekt ELISA için uygun bulunmamıştır (119).

HSP70'in fonksiyonel özellikleri, immün yanıtlardaki rolleri, patogeneze ve parazitlerin hayatta kalmasındaki rolleri, yeni ilaç keşifleri ve parazit aşı adayları ve son olarak bazı parazitler hastalıklarının tanı ve genotiplendirilmesinde kullanımları üzerine yapılan çalışmalar umut vericidir.

Bu tezin amacı, koyunlarda *T. multiceps* HSP70'in kodladığı genin klonlanıp eksprese edildikten sonra pürifiye edilen rekombinant TmHSP70

antijeninin koyun coenurosisinin tanısındaki etkinliğinin belirlenmesi ve saha şartlarında uygulanabilir bir kit geliştirilmesidir.



4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. *Coenurus cerebralis* Kistinin Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan *C. cerebralis* kisti, dönme, iştahsızlık, kilo kaybı ve koordinasyon bozukluğu gibi klinik belirtiler gösteren ve coenurosis şüphesi ile kesilen bir koyundan elde edildi. Bu koyun kafası kesimi takiben en kısa sürede soğuk zincirde Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na ulaştırıldı ve bir patoloji uzmanı denetiminde açılarak *C. cerebralis* kisti elde edildi. Kist, beyinden çıkarıldıktan sonra toplanan protoskoleksler ayrıldı ve steril PBS (pH=7.4) ile yıkandıktan sonra mRNA izolasyonu için kullanıldı.

4.2. Kan-Serum Örneklerinin Toplanması

Elde edilecek rekombinant proteinin saha örneklerindeki teşhis gücünün değerlendirilmesi amacıyla Elazığ ve Bingöl illerinden Şubat-Haziran 2019 döneminde toplam 1207 adet kan serum örneği toplandı. Bu amaçla ilk olarak nekropsi sonrası kesin teşhisi yapılmış altı adet kesin pozitif koyundan ve spesifite değerlendirmesi yapılmak üzere ise yeni doğan kuzulardan toplam 20 adet negatif kan serum örneği toplandı. Bunun yanı sıra enfekte olduğundan şüphelenilen koyun bulunan sürülerden klinik belirti gösteren hayvanlar seçilerek 17 serum daha hem ELISA hem de WB ile test edilmek üzere toplandı. Diğer kan örnekleri ise hayvan sahiplerinden klinik belirti gösterdiği bilgisi alınan ve meraya çıkmış hayvanların bulunduğu farklı sürülerden toplandı. Sahadan toplanan kan serum örneklerinin toplandığı yerleşim yerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Kan-serum örneklerinin toplandığı yerleşim yerleri.

Örnek	Örnek sayısı (adet)
Bingöl-Sarıçiçek köyü	90
Elazığ-Yeniköy köyü	260
Elazığ-Tepeköy köyü	127
Elazığ-Cip köyü	96
Elazığ-Sütlüce köyü	260
Elazığ-Merkez	32
Elazığ- Zafran köyü	202
Elazığ-Baskil ilçesi	55
Elazığ-Kuşhane köyü	25
Elazığ-Bahçekapı köyü	60
TOPLAM	1207

4.3. Laboratuvar Çalışmaları

Kan örnekleri, koyunların *vena jugularis*'inden vakumlu 5 ml'lik serum tüplerine alındı ve serumu ayrılmak üzere soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı. Laboratuvara getirildikten sonra serum tüpleri santrifüj cihazına (Centurion Scientific, UK) yerleştirilip 4000 rpm'de beş dk santrifüj edildikten sonra üst kısımda oluşan serum, pipet yardımı ile 1,5 ml'lik ependorf tüplere transfer edildi ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

4.4. Total RNA ve mRNA İzolasyonu

İçerik detayları Tablo 2’de gösterilen RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak total RNA elde edildi. Bu amaçla, kist içerisinden toplanan protoskoleksler cam boncuklu ependorf tüp içerisine alındı. Üzerine kit içerisinde bulunan 600 µl Buffer RLT (β -mercaptoethanol eklenmiş) ilave edilerek protoskoleksler MagNA Lyser (üç boyutlu karıştırıcı) ile 7000 devirde dokuz dk parçalandı. Gözle görünür doku parçası kalmayana kadar vorteks işlemine devam edildi ve ardından 3 dakika maksimum devirde santrifüj işlemi yapıldı. Takiben süpernatant yeni bir ependorf tüpe aktarıldı. Bu basamaktan sonra QIAcube System kullanılarak 30 dakika sonunda total RNA elde edildi.

Tablo 2. RNeasy Mini Kit içeriği

Kitin İçeriği	50 örnek için
RNeasy Mini Spin Columns	50 adet
Collection Tubes (1,5 ml)	50 adet
Buffer RLT	45 ml
Buffer RW1	45 ml
Buffer RPE	11 ml
RNase-Free Water	10 ml

4.5. Reverse-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Yöntemi ile cDNA Eldesi

Bu amaçla Qiagen- one-step RT-PCR kit prosedürleri takip edilerek master mix hazırlandı (Tablo 3) ve bütün işlemler soğuk blok üzerinde gerçekleştirildi.

Tablo 3. Reverse-transkriptaz-PCR kit içeriği ve kullanım miktarları.

Reaktifler	Örnek sayısı X μ l
Molecular grade water	6,6 μ l
5X RT-PCR buffer	4 μ l
dNTP mix	0,8 μ l
Random primer	2 μ l
RT-PCR enzim mix	0,8 μ l
RNase inhibitor	0,8 μ l
Toplam hacim	15 μ l

Her tüpe 15 μ l master mix ve 5 μ l template RNA eklenerek toplam hacim 20 μ l olarak ayarlandı. Tablo 4’de gösterilen RT-PZR basamaklarının uygulanması için örnekler ısı döngü cihazına (TC-PLUS, Techne) (Şekil 2) yerleştirildi.

Tablo 4. RT-PZR şartları.

Ön denatürasyon	94° C	1 dk	} 25 siklus
Bağlanma	50° C	1 dk	
Uzama	72° C	1 dk	
Son uzama	72° C	10 dk	

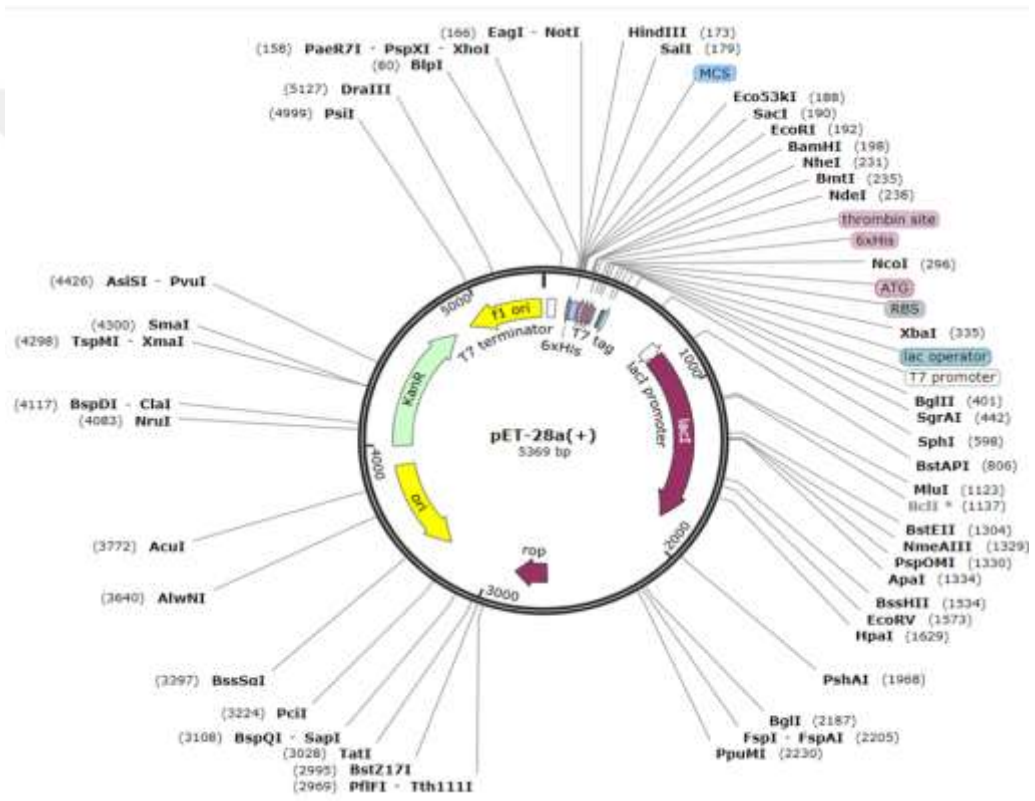
RT-PZR işlemi sonucunda elde edilen cDNA kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklandı.



Şekil 2. RT-PZR için kullanılan ısı döngü cihazı.

4.6. Vektör Seçimi

Klonlama ve ekspresyon basamaklarında kullanılan T7 promotor ve 6-His bağlı pET28(a) vektörü Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nden temin edildi. Çalışmada kullanılan pET-28(a)'nın vektör haritası Şekil 3'de gösterilmiştir. Yine vektöre ait çoklu klonlama bölgesi ve enzim kesim bölgeleri de Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 3. pET-28(a) vektör haritası.

Tablo 5. *Taenia multiceps* tam genom sekansından dizayn edilen TmHSP70 primerlerine ait nükleotid dizileri. Yeşil ile işaretli dizi *NdeI* enzim kesim bölgesini, kırmızı ile işaretli dizi ise *XhoI* enzim kesim bölgesini göstermektedir.

Primer Adı	Primer Dizisi
TmHSP70-F	5'-GGGC CATATG GAACAGTCGGCTTGAGGGAA-3'
TmHSP70-R	5'-GGGC CTCGAG TGCATGGAAAGCTCCGAAGT-3'

4.8. *Taenia multiceps* Heat Shock Protein 70 (HSP70) Geninin Çoğaltılması

TmHSP70-F ve TmHSP70-R primerleri kullanılarak TmHSP70 gen bölgesi PZR ile çoğaltıldı. PZR karışımı Tablo 6'da gösterildiği gibi hazırlandı.

Tablo 6. TmHSP70 geninin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı.

Reaktifler	Miktar (μl)
10X PZR Tamponu	5
25 mM MgCl ₂	5
dNTP	4
TmHSP Forward primeri	1
TmHSP Reverse primeri	1
Taq DNA Polymerase	0,2
dH ₂ O	28,8
cDNA (template)	5
Toplam	50

PZR ısı döngü şartları, 95 °C'de 3 dakika ön denatürasyon aşamasını takiben toplam 35 PZR siklusu olacak şekilde 94°C'de bir dakika denatürasyon, 53°C'de

bir dk hibridizasyon ve 72 °C’de bir dakika sentez aşamasını takiben 72 °C’de 10 dk ekstra sentez şeklinde uygulandı. Elde edilen ürünler %1,4’lük agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Jel hazırlandıktan sonra 10 µl PZR ürünü 5 µl yükleme solüsyonu (1/6 oranında sulandırılmış, Sigma,-Aldrich, G2526) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Elektroforez işlemi, Tris-Asetat-EDTA (TAE) tampon solüsyonu kullanılarak jel tankında 90 volt akımda 40 dakika süreyle gerçekleştirildi ve daha sonra tanktan çıkarılan jel, UV transilluminatörde bandların varlığı yönünden incelendi.

4.9. Restriksiyon Enzimleri İle Kesim

Enzim kesim reaksiyonları plazmid DNA’sı ve TmHSP70F/R primerleriyle amplifiye edilmiş PZR ürünleri için ayrı ayrı kuruldu. Enzim tamponları ortak olduğu için tek tüpte çift enzim kesimi uygulandı ve bütün işlemler soğuk blok üzerinde gerçekleştirildi. Enzim kesim reaksiyonu Tablo 7’de gösterildiği şekilde ayarlandı.

Tablo 7. Restriksiyon enzimleri ile kesim protokolü.

Reaktifler	PZR ürünü	Vektör DNA
<i>XhoI</i> (BioLabs, New England)	1 µl	1 µl
<i>NdeI</i> (BioLabs, New England)	1 µl	1 µl
Cut Smart Buffer	2 µl	2 µl
cDNA	500 ng/µl	500 ng/µl
dH ₂ O	Değişken	Değişken
Toplam hacim	20 µl	20 µl

Reaksiyon hazırlandıktan sonra ürünler ısı döngü cihazında (SensoQuest) 37 °C’de iki saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde enzimlerin inaktivasyonunu sağlamak amacıyla 65 °C’de 20 dakika daha bekletildi. Kesim işleminin kontrolü amacıyla kesim ürünlerinden 5 µl alınarak %1’lik agaroz jelde yürütüldü ve UV transilluminatörde bandların varlığı yönünden incelendi.

4.10. Jelden İzolasyon

Elektroforez ile görüntüleme sonucunda beklenen büyüklükte gözlenen bandlar, klonlanma öncesinde saflaştırılma amacıyla QIAquick Gel Extraction Kitinin (Qiagen) önerileri doğrultusunda jelden izole edildi.

Ticari kitin önerileri doğrultusunda jelden izolasyon işlemi aşağıda belirtilen basamaklar takip edilerek gerçekleştirildi;

- 1) Steril bir bistüri yardımıyla hedef büyüklükteki band jelden kesildikten sonra steril 1.5 ml’lik ependorf tüp içerisine aktarıldı.
- 2) Darası alınan ependorf tüp içerisindeki jelin ağırlığı ölçüldü.
- 3) Jel parçasının ağırlığına göre 100 mg ağırlığındaki bir jel parçası için 300 µl QG buffer tüp içerisine eklendi.
- 4) Ependorf tüp 50 °C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı ve 2-3 dakika aralıklarla vorteksleme işlemi yapıldı.
- 5) Jel parçası tamamen çözüldükten sonra tüp içerisindeki sıvının tamamı kit içerisinde bulunan spin kolona aktarıldı.
- 6) Kolon 14.000 rpm’de bir dakika santrifüj edilerek sıvı uzaklaştırıldı.

- 7) Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra spin kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildi. Üzerine 500 µl QG Buffer eklenerek 14.000 rpm’de bir dakika santrifüj edildi.
- 8) Yıkama aşamasında kolon içerisine 750 µl PE Buffer eklendi ve 14.000 rpm’de bir dakika santrifüj edildi.
- 9) Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kolon 1 dakika daha boş şekilde santrifüj edildi ve kalıntılar uzaklaştırıldı.
- 10) Spin kolon 1,5 ml’lik steril ependorf tüp içerisine yerleştirildi. Üzerine 25 µl EB Buffer eklenerek 14.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek filtrede bulunan PZR ürününün elüsyonu sağlandı. Elde edilen restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve jelden pürifiye edilmiş plazmid DNA’sı ve PZR ürünü klonlama işleminde kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edildi.

4.11. TmHSP70 Geninin Klonlanması

4.11.1. TmHSP70 Geninin pET28-(a) Plazmidine Ligasyonu

Jelden pürifiye edilmiş plazmid DNA’sı ve PZR ürünü ligasyon işlemine tabii tutulmadan önce ürünlere Sodyum Asetat ($C_2H_3NaO_2$) çöktürmesi işlemi uygulandı. Bu amaçla;

- 1- Jelden izolasyon sonucunda elde edilen 25 µl saf plazmid ve PZR ürünü tek bir ependorf tüpte birleştirildi.
- 2- 1:10 oranında 3 M Sodyum Asetat eklendi (pH= 5,2).
- 3- Toplam hacmin (55 µl) üç katı oranda %95 ethanol ilave edildi.
- 4- Bir gece boyunca -20 °C’de çökme işlemi için bırakıldı.
- 5- Ertesi gün ependorf tüp 14.000 rpm’de 30 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu.

- 6- Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve kalan şeffaf renkteki pelet üzerine 500 µl %70 ethanol ilave edildikten sonra ependorf tüp 14.000 rpm’de 20 dk santrifüj edildi.
- 7- 6. Basamak tekrarlandı
- 8- Ependorf tüp kapağı açık bir şekilde bir dk 14.000 rpm hızda santrifüj edildi.
- 9- 20 dk boyunca kapağı açık bir şekilde oda ısısında bekletildi.
- 10- Alkolün iyice uçması sağlandıktan sonra kalan pelet üzerine 8 µl dH₂O eklenerek peletin çözünmesi sağlandı. Ligasyon reaksiyonu Tablo 8’de verildiği şekilde oluşturuldu.

Tablo 8. Ligasyon reaksiyonu içerik ve miktarları.

Reaktifler	Miktar
Resüspanse Pelet	8 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
T4 DNA Ligaz Buffer	1 µl
Toplam	10 µl

Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra ısı döngü cihazında (SensoQuest) 22,5 °C’de iki saat inkübasyona bırakıldı.

4.11.2. Kompetan *E. coli* DH5α Hücrelerinin Hazırlanması

1. Çalışmada kullanılan kompetan *E. coli* DH5α suşu Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü kültür stoklarından temin edilen gliserol stoktan alınarak LB agar besiyerine öze ile çizilerek ekildi ve 37 °C’de 16 saat inkübasyona bırakıldı.

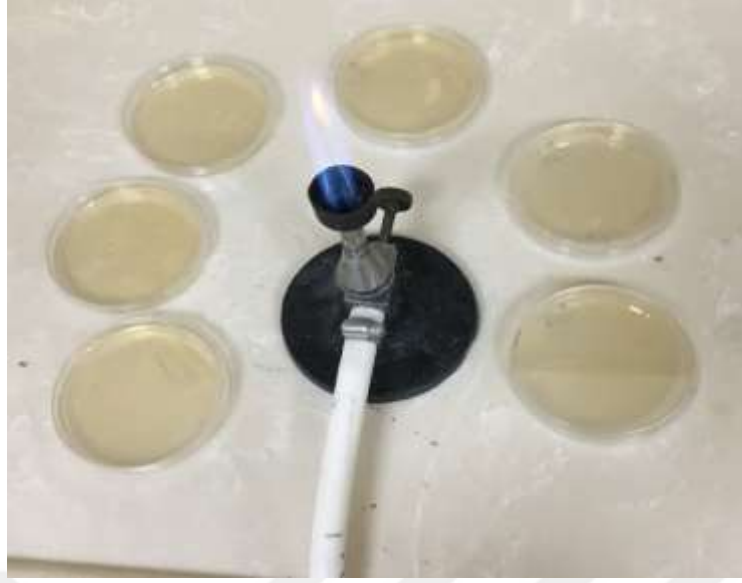
2. 16 saatlik inkübasyon sonrası LB agar besiyerinden seçilen tek koloni steril bir kürdan yardımıyla 5 ml LB Broth besiyerine ekildi ve 37 °C’de 225 rpm’de 16 saat inkübasyona bırakıldı.
3. Bu sıvı kültürden 500 µl alınarak daha önceden hazırlanan 100 ml LB Broth besiyerine inoküle edildi ve OD600 değeri 0,35-0,4 aralığına ulaşana kadar 37 °C ve 225 rpm’de inkübasyona bırakıldı.
4. Sıvı kültür beklenen OD600 aralığına ulaştığında ise steril 15 ml’lik falkona alınıp 20-25 dk buz içerisinde bekletildi ve bundan sonraki aşamalarda santrifüj dışındaki işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi.
5. 15 ml’lik falkonlara bölünen besiyerleri 0 °C’de 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi.
6. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, 4 °C’de saklanan 12 ml 30 mM CaCl₂, 0.45 µm filtreden geçirilerek pelet üzerine eklendi. Resüspanse edildikten sonra 20 dk buz üzerinde bekletildi ve 0 °C’de 4000 rpm’de 10 dk santrifüj işlemi tekrarlandı.
7. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 490 µl 30 mM CaCl₂ ve 10 µl steril %50 gliserol eklendi. Resüspanse edildi ve 15 dk buz üzerinde bekletildi.
8. 50 µl’lik hacimlerde steril ependorflara bölünerek porsiyonlama yapıldı ve kullanılıncaya kadar -80 °C’de saklandı.

4.11.3. Rekombinant Plazmidin *E. coli* DH5α Suşu Kompetan

Hücrelere Transformasyonu

- 1- Transformasyon basamağında -80 °C’de bulunan kompetan hücreler buz üzerinde yaklaşık 30 dk çözdürüldü.

- 2- Ligasyon reaksiyonundan 5 µl alınarak 50 µl kompetan hücrenin üzerine ilave edildi ve 30 dk buz üzerinde inkübe edildi.
- 3- Ardından 42 °C’de su banyosuna yerleştirilen ependorf tüpler 2 dakika ısı şoku uygulandıktan sonra oda ısısına maruz kalmadan tekrar buz üzerine alındı ve 5 dakika daha buz üzerinde bekletildi.
- 4- Transformasyon işleminden sonra hücrelerin iyileştirme süreci için reaksiyonun üzerine 300 µl LB sıvı besi yeri ilave edildi ve 1,5 saat boyunca 37 °C’deki çalkalamalı inkübatörde çoğaltıldı.
- 5- Ardından ependorflardaki örneklerden 100 µl alınarak steril hücre yayıcı yardımıyla 50 µl/ml kanamisin (Kanovet) içeren LB agara yayma ekimleri yapıldı. Ependorf tüplerde kalan örnekler 14.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 50 µl alındıktan sonra geri kalan kısmı uzaklaştırıldı. Pelet, alınan 50 µl süpernatant ile resüspanse edildikten sonra dip ekim olarak LB agar petrisine ekimleri yapıldı. Ekimi yapılan petriler yaklaşık 30 dk alevin etrafında kurumaya bırakıldı (Şekil 5). Kuruyan petriler 37 °C’de bir gece inkübasyona bırakılarak ertesi gün koloni varlığı yönünden kontrol edildi.



Şekil 5. LB Agar besi yeri hazırlık ve ekim aşamaları.

4.11.4. Koloni PZR Yöntemi ile Kolonilerin Taranması

Transformasyonun ardından bir gece inkübe edilen petrilerde oluşan kolonilerin istenen gen ürününü içerip içermediğini tespit etmek amacıyla koloniler, koloni PZR yöntemi ile tarandı. Bu yöntemde ligasyon reaksiyonlarının *E. coli* DH5α hücrelerine transformasyonundan elde edilen koloniler doğrudan PZR reaksiyonu için template olarak kullanıldı. Bu amaçla koloni PZR reaksiyonu Tablo 9'da gösterildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 9. Koloni PZR reaksiyon karışımı ve miktarları.

Reaktifler	Miktar
Template	1 Koloni
10x PZR Tamponu	2 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
10 mM dNTP	3 µl
T7/F	2 µl
T7/R	2 µl
dH ₂ O	4 µl
Toplam	15 µl

Belirtilen şekilde hazırlanan reaksiyona steril bir kürdan yardımıyla alınan koloniler eklendi. 95 °C’de 10 dk *E. coli* hücrelerinin tahrip olması için ön denatürasyon işlemi uygulandı. Başka bir tüpte her bir örnek için 5 µl dH₂O ve 0,2 µl Taq DNA Polimeraz karıştırılıp hazırlanan karışıma eklendi. Ürünler ısı döngü cihazına konuldu ve 95 °C’de beş dk ön denatürasyon, 94 °C’de bir dk denatürasyon, 55 °C’de bir dk bağlanma, 72 °C’de bir dk uzama (toplam 25 siklus) ve 72 °C’de beş dk son uzama olacak şekilde programlama yapıldı. PZR işlemi sonucunda elde edilen ürünler %1,4’lük agaroz jelde yürütüldü ve UV transilluminatörde bandların varlığı yönünden incelendi.

4.11.5. Rekombinant Plazmidlerden Gliserol Stokların Hazırlanması

İlgili gen bölgesi varlığı koloni PZR yöntemiyle tespit edilen kolonilerden steril kürdan yardımıyla alınıp 50 µg/ml oranında kanamisin içeren 5 ml LB sıvı besi yerine inoküle edildi. 37 °C ve 250 rpm’deki çalkalayıcılı etüvde bir gece boyunca üretildi. Elde edilen kültürlerden 500 µl alınıp, 500 µl %50’lik steril gliserol çözeltisi eklenerek gliserol stoklar hazırlandı ve -80 °C’de saklandı.

4.11.6. Çapraz PZR Denemeleri İçin Plazmid İzolasyonu

Plazmid izolasyonu için Qiagen Miniprep Kit (Qiagen, N.V) prosedürü takip edildi. Ticari kitin önerileri doğrultusunda plazmid izolasyonu işlemi aşağıdaki şekilde yapıldı:

1) Elde edilen peletin üzerine, kit içerisinde bulunan RNase A ve LyseBlue eklenmiş 250 µl Buffer P1 eklenerek peletin resüspanse olması sağlandı. LyseBlue partikülleri tamamen çözünene kadar vorteks işlemi yapıldı.

2) Üzerine 250 µl Buffer P2 eklenerek, 4-5 kez yavaşça ters düz edildi. Homojen mavi renk oluşana kadar işleme devam edildi (Şekil 6).



Şekil 6. Kit prosedürünün ikinci basamağından sonra oluşan mavi renk.

3) Daha sonra üzerine 350 µl Buffer N3 eklendi ve vakit kaybetmeden mavi renk kaybolana kadar ters düz edildi.

4) Karışım 13.000 rpm’de 10 dk santrifüje tabi tutuldu.

5) 800 µl süpernatant spin-kolona transfer edildi.

6) 30-60 saniye maksimum devirde santrifüj edildi.

7) Spin-kolon üzerine 500 µl Buffer PB eklenerek, 30-60 saniye santrifüj edildi.

8) 750 µl Buffer PE eklendikten sonra 30-60 saniye santrifüj edildi. Buffer'ı tamamen uzaklaştırmak için bir dk daha santrifüj işlemine devam edildi.

9) Spin-kolon steril mikrosantrifüj tüpüne alınarak 50 µl Elution Buffer eklendi, 1 dk oda ısısında bekletildikten sonra, bir dk maksimum devirde santrifüj edildi. Elde edilen pürifiye plazmid, %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrolü sağlandı ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

4.11.7. Çapraz PZR Kontrolleri

Çapraz PZR 1: TmHSP70 Forward-Reverse primerleri kullanılarak PZR reaksiyonu kuruldu. Bu işlemin amacı klonlama sonrası rekombinant vektörün TmHSP70 gen bölgesini içerip içermediğini kontrol etmektir. Bu işlem sonrası beklenen band büyüklüğü 547 bp olarak belirlendi.

Çapraz PZR 2: TmHSP70 Forward-T7 Reverse primerleri kullanılarak PZR reaksiyonu kuruldu. Bu işlemin amacı klonlama sonrası gen bölgesinin vektöre doğru oryantasyonda bağlanıp bağlanmadığını kontrol etmektir. Bu işlem sonrası beklenen band büyüklüğü 642 bp olarak belirlendi.

Çapraz PZR 3: T7 Forward-TmHSP70 Reverse primerleri kullanılarak PZR reaksiyonu kuruldu. Bu işlem, klonlama sonrası gen bölgesinin vektöre doğru oryantasyonda bağlanıp bağlanmadığını kontrol etmek amacıyla yapıldı. Bu işlem sonrası beklenen band büyüklüğü 698 bp olarak belirlendi.

Çapraz PZR 4: T7 Reverse-TmHSP70 Reverse primerleri kullanılarak PZR reaksiyonu kuruldu. Bu işlem, klonlama sonrası gen bölgesinin vektöre doğru oryantasyonda bağlanıp bağlanmadığını kontrol etmek amacıyla yapıldı. Bu işlem sonrası herhangi bir band beklenmemektedir.

4.12. IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) Miktarı ve Ekspresyon Denemeleri

Pilot ekspresyon denemeleri ekspresyon için gerekli olan IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) miktarını ve indüklenme saatini optimize etmek için yapıldı.

Bu amaçla;

1. Transforme *E. coli* DH5 α bakterisi içeren gliserol stoklardan özenin ucuna alınarak 2,5 ml LB sıvı besiyerine ekim yapıldı. Ertesi gün 50 μ g/ml kanamisin içeren 50 ml LB sıvı besiyerine aktarıldı ve 37 °C’de çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
2. İnkübasyona bırakılan besiyerlerinin Optik Dansite (OD) değerlerini belirlemek için spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçümleri yapıldı. OD₆₀₀ değeri 0,5-0,8 arasına geldiğinde LB sıvı besiyerleri beş adet 10 ml hacimdeki falkonlara bölünerek porsiyonlara ayrıldı.
3. Son konsantrasyonları sırasıyla 0,01; 0,1; 0,5; 1 ve 2 mM olmak üzere IPTG (Thermo Fisher, R1171) ilave edildi.
4. IPTG içeren besiyerleri 37 °C’de inkübasyona bırakıldı ve beş saat boyunca her saat 1 ml örnek alınıp ependorflara konuldu.

5. Toplanan ependorflar 14.000 rpm’de bir dk santrifüj edilip süpernatant kısmı atıldı. Kalan pelet SDS-PAGE analizi yapılmak üzere -20 °C’de saklandı.

4.13. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) Analizi

Peletlerin ekspresyon analizlerini yapmak üzere SDS-PAGE jeli hazırlandı.

Bu amaçla kullanılan tampon ve solüsyonlar aşağıda verildiği gibidir.

%10 SDS	Miktar
SDS	10 g
dH ₂ O	100 ml

%30 Acrylamide-Bisacrylamide	Miktar
Acrylamide	29,2 g
Bisacrylamide	0,8 g
dH ₂ O	100 ml

%10 Ammonium Persulphate (APS)*	Miktar
APS	0,1 g
dH ₂ O	1 ml

*Bu solüsyon her defasında taze olarak hazırlandı

Tank Buffer (Tris-glisin buffer)*	Miktar
Glycine	14,4 g
Tris base	3,03 g
%10 SDS	10 ml
dH ₂ O	985 ml

*Bu karışım pH 8,3'e ayarlanarak +4 °C'de muhafaza edildi

2X SDS Sample Buffer	Miktar
1 M Tris-Cl (pH=6,8)	2,5 ml
SDS	1 g
Bromphenol blue	10 mg
%87 Glycerol	5,75 ml
0.5 M EDTA (pH=8)	2,5 ml
β-mercaptoethanol	0,5 ml

Bu karışıma 12,75 ml dH₂O eklenerek total hacim 25 ml'ye ayarlandı ve porsiyonlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

Boyama Solüsyonu (Staining)	Miktar
%1 Coomassie Brilliant Blue R 250	5 ml
Methanol	100 ml
Glacial asetik asit	5 ml
dH ₂ O	20 ml

Açma Solüsyonu (Destaining)	Miktar
Methanol	30 ml
Glacial asetik asit	10 ml

dH ₂ O	60 ml
-------------------	-------

Jelin formasyonunu sağlamak için TEMED (N, N, N, N-tetramethylethylenediamine) (Chemsolute, 8072.0100), moleküler ağırlık markeri olarak da 10-170 kDa Protein Ladder (Thermo Scientific, USA) kullanılmıştır.

4.13.1 Separasyon Jelinin (%15) Hazırlanması

Separasyon jelinin içeriği ve kullanılan miktarlar Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Separasyon jelinin içeriği ve kullanılan miktarlar.

Reaktif	Miktar
%30 Acrylamide-Bisacrylamide	4 ml
1,5 mM Tris-CI (pH= 8,8)	2 ml
%10 SDS	80 µl
%10 APS	80 µl
dH ₂ O	1,8 ml
TEMED	7 µl

4.13.2 Stacking Jelinin (%6) Hazırlanması

Stacking jelinin içeriği ve kullanılan miktarlar Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Stacking jelinin içeriği ve kullanılan miktarlar.

Reaktif	Miktar
%30 Acrylamide-Bisacrylamide	1 ml
0,5 mM Tris-CI (pH=6,8)	1,25 ml
%10 SDS	50 µl
%10 APS	50 µl
dH ₂ O	2,6 ml
TEMED	5 µl

1- Jel sisteminin cam plakları alkol ile yıkanıp kurulandıktan sonra sızdırma yapmayacak şekilde jel dökme aparatına yerleştirildi. Distile su ile sızdırmazlık

kontrolü yapıldı ve separasyon jeli hazırlandıktan sonra cam plakların alttan 2/3'lük kısmına kadar pipet yardımı ile döküldü.

2- Üst kısmın düzgün bir şekilde jelleşmesi ve jelin hava ile temasının kesilmesi için 1 ml propanol eklenip oda ısısında jelleşmeye bırakıldı.

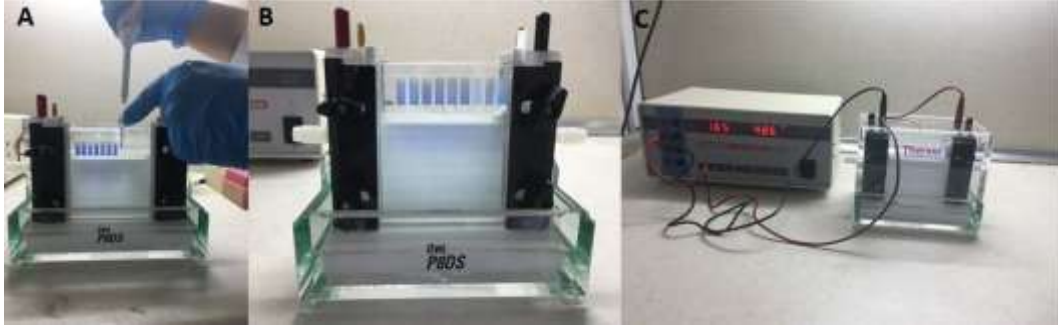
3- Stacking jel hazırlandıktan sonra polimerize olmuş separasyon jelinin üzerindeki propanol atılıp birkaç kez distile su ile yıkandıktan sonra kurutma kağıdı yardımıyla kalan distile su kurutuldu ve üzerine stacking jel solüsyonu pipet yardımı ile dökülüp 10 kuyucuklu tarak jele yerleştirildikten sonra oda ısısında jelleşmeye bırakıldı.

4- IPTG ile indüklenen hücrelerin proteini eksprese edip etmediğini analiz etmek için indükleme aşamasında saat başı alınan örneklerin üzerine aynı hacimdeki 2X Sample Buffer eklenerek 10 dk kaynatıldı ve SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına yüklendi (Şekil 7A).

5- Her jele protein belirtecinden 5 µl yüklendi. Örnekler 20 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendikten sonra elektroforez tankı 1X SDS-PAGE yürütme tampon çözeltisi ile doldurularak güç kaynağı 165 V akıma ayarlanarak örnekler tankın alt kısmına gelene kadar yürütüldü (Şekil 7B-C).

6- Elektroforez bittikten sonra cam plakalardan çıkarılan jel, Coomassie blue boyama çözeltisi içerisinde bir gece çalkalayıcı üzerinde inkube edildi. Ertesi gün jelin üzerine yüzeyini kaplayacak miktarda açma solüsyonu (destaining) çözeltisi eklenerek protein bandları görünür hale gelene kadar yaklaşık üç saat inkübe edildi.

7- Yeterince rengi açılan jel protein varlığı yönünden incelendi.



Şekil 7. SDS-PAGE aşamaları. A: Örneklerin poliakrilamid jeldeki kuyucuklara yüklenmesi, B: Separasyona hazır jelin görüntüsü, C: Jelin separasyonu aşaması.

4.14. Rekombinant TmHSP70 Proteininin Ekspresyonu

Gliserol stoklardan alınan koloniler yine kanamisin içeren 50 ml’lik LB ortamında, 37 °C’ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 250 rpm hızda bir gece çoğaltıldı. Ertesi sabah, bu kültürler 500 ml’lik ilgili antibiyotiği içeren büyük hacimdeki LB ortamına aktararak 37 °C’de 250 rpm’de OD600 değeri 0,5-0,8 oluncaya kadar inkübe edildi. İstenen hücre yoğunluğuna ulaşıldığında daha önceden ekspresyon denemelerinde karar verildiği gibi ekspresyonu indüklemek için karar verilen miktarda IPTG ilavesi yapıldı. Ekspresyon süresi ise yine pilot denemelerde belirlendiği gibi yapıldı. Ekspresyon aşaması bittikten sonra besiyerleri 50 ml’lik falkon tüplere bölünerek 4 °C’de soğutmalı santrifüjde 4.000 rpm’de 15 dk santrifüj edilerek peletler pürifikasyon aşamasına kadar -80 °C’de saklandı.

4.15. Protein Pürifikasyonu

Protein pürifikasyon aşaması His-Bind Nikel afinite resini kullanılarak ve denatüre şartlar optimize edilerek gerçekleştirildi. Bu amaçla HisPur™ Ni-NTA

Spin Purification Kit (Thermo Fisher, Cat. No: 88228) kullanıldı. Kit içeriği Tablo 12’de gösterildiği gibidir.

Tablo 12. HisPur™ Ni-NTA Spin Purification Kit içeriği.

Reaktifler	Miktar
HisPur Ni-NTA Spin Kolon	5 Adet/ 1 ml resin
Phosphate-Buffered Saline (10X)	30 ml
Imidazole (2M)	8 ml

HisPur™ Ni-NTA Spin Purification Kit’inde kullanılan tampon ve kimyasallar aşağıdaki gibidir:

Tampon Adı	Molarite	10X PBS	2M Imidazole	dH ₂ O
Dengeleme Tamponu	10 mM	1 ml	50 µl	8,95 ml
Yıkama Tamponu	25 mM	1 ml	125 µl	8,875 ml
Elüsyon Tamponu	250 mM	1 ml	1250 µl	7,75 ml
Kimyasal Adı	Marka			
8M Üre	(Glenthams, GE3329)			
Lizozim	(Serva, 28263.01)			
Protease İnhibitör Kokteyli 100X	(Abbkine, BMP1001)			
Benzonase	(Sigma Aldrich, E1014)			

Pürifikasyon işlemine başlamadan önce hücre peletleri ve kolonlar hazırlandı. Bu amaçla;

- 1- -80 °C’de saklanan peletler buz üzerinde erimeye bırakıldı.
- 2- Eriyen hücre peletlerinin üzerine 2 ml dengeleme tamponu eklendi. Kit içeriğinde bulunan önerilere ek olarak bu basamakta dengeleme tamponunun içerisine, Lizozim (100 µg/ml), Benzonase (250 U/µl) ve EDTA’sız Protease İnhibitor Kokteyli (1 mM, 1X) eklendi.

- 3- 30 dk hafif çalkalayıcıda, buz üzerinde inkübe edildi.
- 4- İnkübasyon bitiminde buz üzerinde sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Sonikatör cihazı bir dk 15 sn boyunca 15 sn durup 15 saniye çalışacak şekilde maksimum frekansta çalıştırıldı.
- 5- Hücreler 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek süpernatant alındı.
- 6- Kalan hücre peletinin üzerine 1 ml 8 M Üre eklenerek homojenize edildi ve sonikasyon işlemi tekrarlandı.
- 7- Hücreler 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek süpernatant alındı ve kolonların hazırlığı aşamasına geçildi.
- 8- Kolonlar oda ısısına alındıktan sonra içerisinde bulunan 1 ml resin resüspanse edildi.
- 9- Resüspanse edilen kolonların alt kısmında bulunan tıplar çıkartılarak santrifüj cihazına yerleştirildi ve 900 rpm'de iki dk santrifüj edilerek resin saklama solüsyonu uzaklaştırıldı.
- 10- Kolona bağlanan resinin üzerine iki katı hacimde dengeleme tamponu eklenerek 30 dk oda ısısında, resinin çökmesini önlemek amacıyla hafif çalkalayıcı üzerinde inkübe edilerek bağlanma işlemine hazırlandı.
- 11- 30 dk sonunda kolonlar 900 rpm'de iki dk santrifüj edilerek tampon uzaklaştırıldı.
- 12- Kolonların içerisindeki resin üzerine daha önce hazırlanan hücreler, resin hacminin 2 katı olacak şekilde kolona transfer edildi.
- 13- 30 dk boyunca hafif çalkalayıcı üzerinde resin ile hücrelerin homojenize olması sağlandı.
- 14- Süre sonunda kolonlar 900 rpm'de iki dk daha santrifüj edildi.

15- Resin üzerine 2 ml hacimde yıkama tamponu eklendi. 900 rpm’de iki dk santrifüj edilerek tampon uzaklaştırıldı ve bu basamak bir kez daha tekrarlandı.

16- 1 ml elüsyon tamponu kolon üzerine eklenerek kolonun altındaki tıpa çıkarıldı ve elüsyon tamponu ve proteinin akması sağlandı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.

17- Pürifikasyon işlemi tamamlanan proteinler -80 °C’de saklandı. Pürifikasyon işleminin başarılı olup olmadığını kontrol etmek amacıyla pürifiye protein SDS-PAGE analizi ile gösterildi. Bu işlemler “4.13. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) Analizi” başlığında anlatıldığı şekilde yapıldı.

SDS-PAGE analizi ile gösterilen rekombinant pürifiye TmHSP70 proteini Western-Blot ve ELISA testlerinde kullanılmak üzere -80 °C’de saklandı.

4.16. Western Blot Analizi

Bu işlemde kullanılan solüsyon ve tamponlar aşağıdaki gibidir:

Transfer Tamponu (Towbin Buffer)*	Miktar
Glycine	2,9 g
Tris-base	5,8 g
SDS	0,37 g
Methanol	200 ml
dH ₂ O	800 ml

*Bu karışım hazırlandıktan sonra pH=8,3’e ayarlandı ve +4 °C’de saklandı.

10X PBS*	Miktar
NaCl	8 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
dH ₂ O	800 ml

*Bu karışımın son hacmi 1000 ml'ye tamamlanıp pH=7,4'e ayarlandı ve +4 °C'de saklandı.

%0,1 PBS+Tween 20 (PBST) Yıkama Solüsyonu	Miktar
1X PBS	1000 ml
Tween-20	1 ml

%0,02 PBS+Tween 20 (PBST) Yıkama Solüsyonu	Miktar
1X PBS	1000 ml
Tween-20	200 µl

%5 Bloklama Solüsyonu	Miktar
Yağsız süt tozu	5 g
1X PBS	100 ml

Substrat Solüsyonu*	Miktar
DAB kromojen (Pierce™ DAB Substrate Kit, Thermo Fisher, Cat. No: 34002)	2,5 ml
DAB Substrat Solüsyonu	22,5 ml

*Bu karışım görüntüleme aşamasında taze olarak koyu renkli cam şişe içinde hazırlandı.

Western blot analizi, SDS-PAGE ile varlığı gösterilen rekombinant TmHSP70 proteininin immünojen olup olmadığını doğrulamak için yapıldı. Bu amaçla ıslak transfer sistemi kullanıldı (CBS Scientific Electrophoretic Blotting System, EBU-102).

Western blot aşaması aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı:

1- Poliakrilamid jel elektroforezi tamamlanan jel cam kasetlerden çıkarılıp stacking jeli ait kısım kesilerek uzaklaştırılıp separasyon jeli distile su ile bir kez yıkandı.

2- Separasyon jeli cetvel yardımıyla ölçülerek aynı ebatta 6 adet whatman kâğıdı (3 mm whatman) ile birlikte bir adet Nitrosellüloz membran (Sigma Nitrosellulose electrophoresis grade N-8392 0.45 μ m pore size) kesildi.

3- Transfer tampon çözeltisine alınan membran ve whatman kâğıtları tampon içerisinde bir dk inkübe edildi.

4- Western blot tankının içerisi transfer tamponu ile doldurulduktan sonra, transfer sisteminin anot ve katot süngerleri de tank içerisine alınarak tampon içerisinde ıslatıldı.

5- Islatılmış anot süngeri üzerine sırasıyla üç adet whatman kâğıdı, nitroselüloz membran, jel ve tekrar üç adet whatman kâğıdı yerleştirildi. Membran ve jel arasında hava kabarcığı kalmaması için bir silindir rulo yardımıyla hava kabarcıkları uzaklaştırıldı.

6- Katot süngeri de üzerine kapatıldıktan sonra transfer tankının içerisine yerleştirildi.

7- 30 V sabit akımda 2 saat süre ile transfer işlemi gerçekleştirildi (Şekil 8).

8- Transfer tamamlandıktan sonra jel atıldı ve membran proteinlerin transfer işleminin olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla %10'luk asetik asit içinde hazırlanmış %2'lik Ponceau S (Merck, 27195) boyası içerisinde 1 dk bekletildikten sonra dH₂O ile bandlar görünür hale gelene kadar yıkama

işlemi yapıldı. Transfer işlemi doğrulandıktan sonra membran, bloklama solüsyonu içerisinde +4 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

9- İnkübasyon tamamlandığında, membran %0,1 PBST ile dört kez beşer dk çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

10- Serum sulandırılmaları %0,02 PBST ile 1/200 oranında yapılarak membran 37 °C’de 2 saat süre ile inkübe edildi.

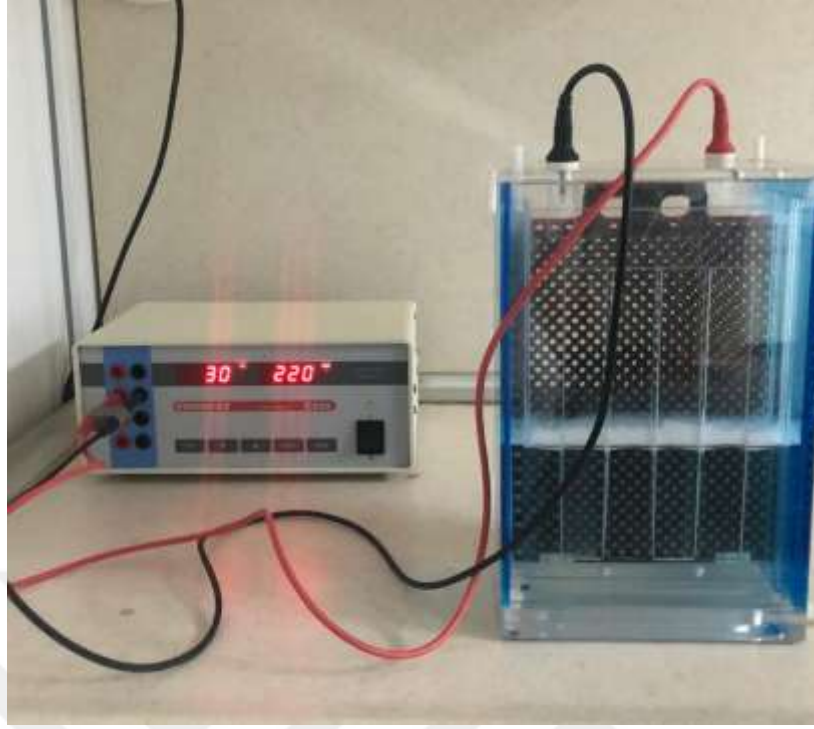
11- Yıkama işlemi yapıldı (9. basamak).

12- Sekonder antikor olan peroksidaz işaretli anti-sheep IgG (Sigma-Aldrich, A3415) antikorü %0,02 PBST ile 1/2000 oranında sulandırılıp membrana eklendi ve 37 °C’de iki saat süre ile inkübe edildi.

13- İnkübasyon tamamlandıktan sonra membran dört kez %0,1 PBS-T ile yıkandı. Son bir kez de Tween 20’yi uzaklaştırmak için 1X PBS ile yıkama yapıldı.

14- DAB substrat kit 22,5 ml substrat, 2,5 ml kromojen olmak üzere hazırlandı.

15- Membran, bulunduğu ortamdan alınıp suyu süzöldükten sonra karanlık oda içerisinde hazırlanan DAB solüsyonuna aktarıldı ve karanlık odada 15 dakika süre ile bandların oluşması beklendi.



Şekil 8. Western-Blot ıslak transfer sistemi.

Serolojik çapraz reaksiyonların kontrolü amacıyla daha önceden laboratuvarımızda bulunan ve kesim sonrası hidatik kist ve *Dicrocoelium dendriticum* oldukları teyid edilen koyunlardan elde edilen kan serumları kullanıldı. Böylelikle, Rekombinant TmHSP70 antijeninin koyunlarda yaygın olarak rastlanan diğer sestod ve trematod türleri ile çapraz reaksiyon verip vermediği kontrol edildi.

4.17. Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bu işlemde kullanılan solüsyonlar ve tamponlar aşağıdaki gibidir:

0,05 M Karbonat-Bikarbonat Tamponu*	Miktar
Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g

*Bu karışım 1000 ml distile su içerisinde çözündürüldükten sonra pH=9,6'ya ayarlandıktan sonra 4 °C'de saklandı.

%0,1 PBS+Tween 20 (PBST)	Miktar
Yıkama Solüsyonu	
1X PBS	1000 ml
Tween-20	1 ml

%0,02 PBS+Tween 20 (PBST)	Miktar
Yıkama Solüsyonu	
1X PBS	1000 ml
Tween-20	200 µl

Substrat Solüsyonu*	Miktar
0,1 M Sitrik Asit	3,68 ml
0,2 M Na ₂ HPO ₄	6,32 ml
%30 H ₂ O ₂	10 µl

*Hazırlanan karışım içerisine 10 mg o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma-Aldrich, P8287) ilave edilerek çözünmesi için manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Bu işlem koyu renkli cam şişede gerçekleştirildi.

Durdurma Solüsyonu 3N HCl	Miktar
%37 HCl	25 ml
dH ₂ O	75 ml

ELISA aşaması aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı:

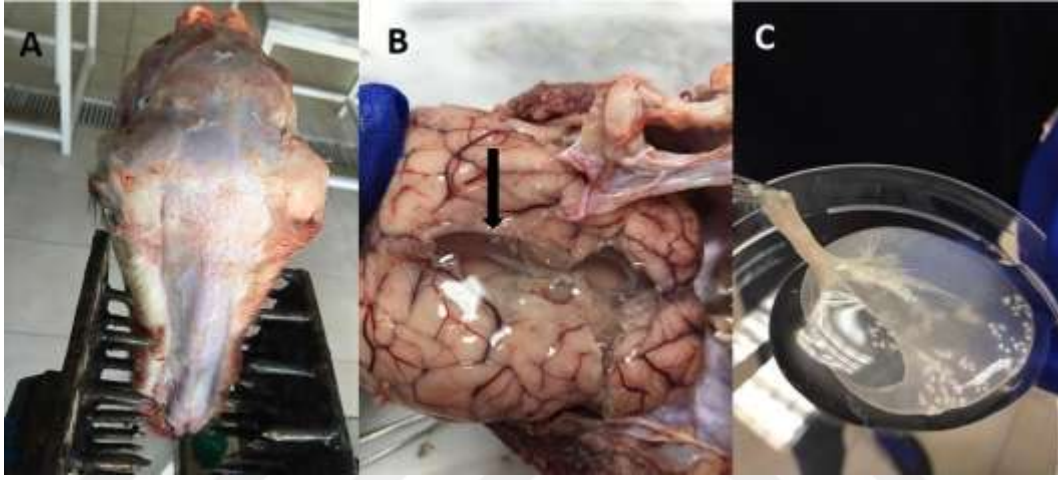
- 1- Rekombinant TmHSP70 proteini 0,05 M Karbonat/Bikarbonat tamponu ile 1/20 oranında sulandırılıp düz tabanlı ELISA pleytinin (SPL, Immunoplate, 32496) her bir kuyucuğuna 100 µl konularak bir gece +4°C’de inkübe edildi.
- 2- Ertesi gün bir kez %0,1 PBST ile yıkanarak 1X PBS ile sulandırılmış %5’lik yağsız süt tozundan her kuyucuğa 130 µl ilave edilerek 37 °C’de iki saat inkübe edildi (bloklama).

- 3- Ardından beş kez %0,1 PBST ile yıkama yapıldı. Takiben serumlar 1/200 oranında %0,02 PBST solüsyonu ile sulandırılarak her bir kuyucuğa 100 µl ilave edilip 37 °C’de iki saat inkübe edildi.
- 4- Bu aşamadan sonra örnekler beş kez %0,1 PBST ile yıkanarak konjugat (anti-sheep IgG, peroxidase labelled, A-3415 Lot No: 21K9181) eklendi. Konjugat, 1/2000 oranında %0,02 PBST ile sulandırılıp her bir kuyucuğa 100 µl konuldu ve 37 °C’de iki saat inkübe edildi.
- 5- Süre sonunda örnekler beş kez %0,1 PBST ile yıkandıktan sonra substrat ilave edildi.
- 6- Substrat solüsyonu her kuyucuğa 100 µl konulup 15 dakika karanlık ortamda bekletildi.
- 7- Renk oluşumu gözlendikten sonra her kuyucuğa 50 µl 3N HCl (durdurma solüsyonu) eklenen pleyt, ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okutuldu.
- 8- Sonuçlar absorbans değerleri olarak alınıp, negatif kontrollerin absorbans değerlerinin aritmetik ortalaması +2 standart sapma ($X+3SD$) değerinin (eşik değer=cut-off) üstü pozitif olarak kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Kistin Elde Edilmesi

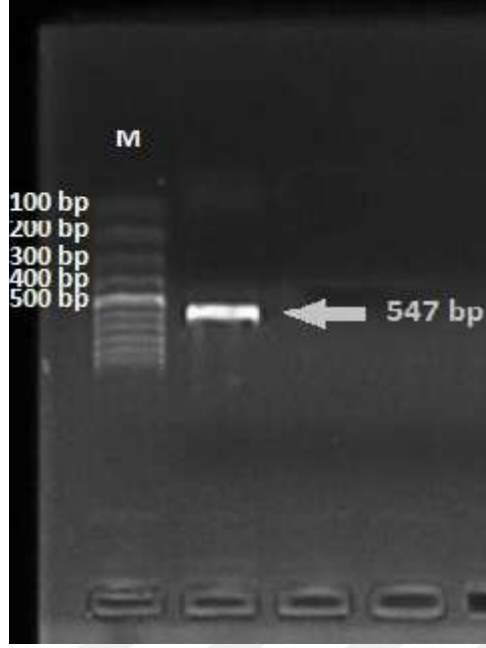
Bu çalışmanın moleküler aşamalarında kullanılan *C. cerebralis* kisti, bir adet şüpheli koyunun nekropsisi ile elde edildi (Şekil 9).



Şekil 9. Nekropsi sonucunda elde edilen *Coenurus cerebralis* kisti. A: Kist şüpheli koyun kafası B: Beyin dokusu içerisinde yer alan *C. cerebralis* kisti C: Beyin dokusundan çıkarılan *C. cerebralis* kisti.

5.2. *Taenia multiceps* HSP70 Geninin Çoğaltılması

Dizayn edilen primer dizileri kullanılarak TmHSP70 geninin çoğaltılması amacıyla PZR işlemleri gerçekleştirildi. PZR ürünlerinin %1,4'lük agaroz jelde yürütülmesi ile elde edilen 547 bp büyüklüğündeki band Şekil 10'da gösterilmiştir.

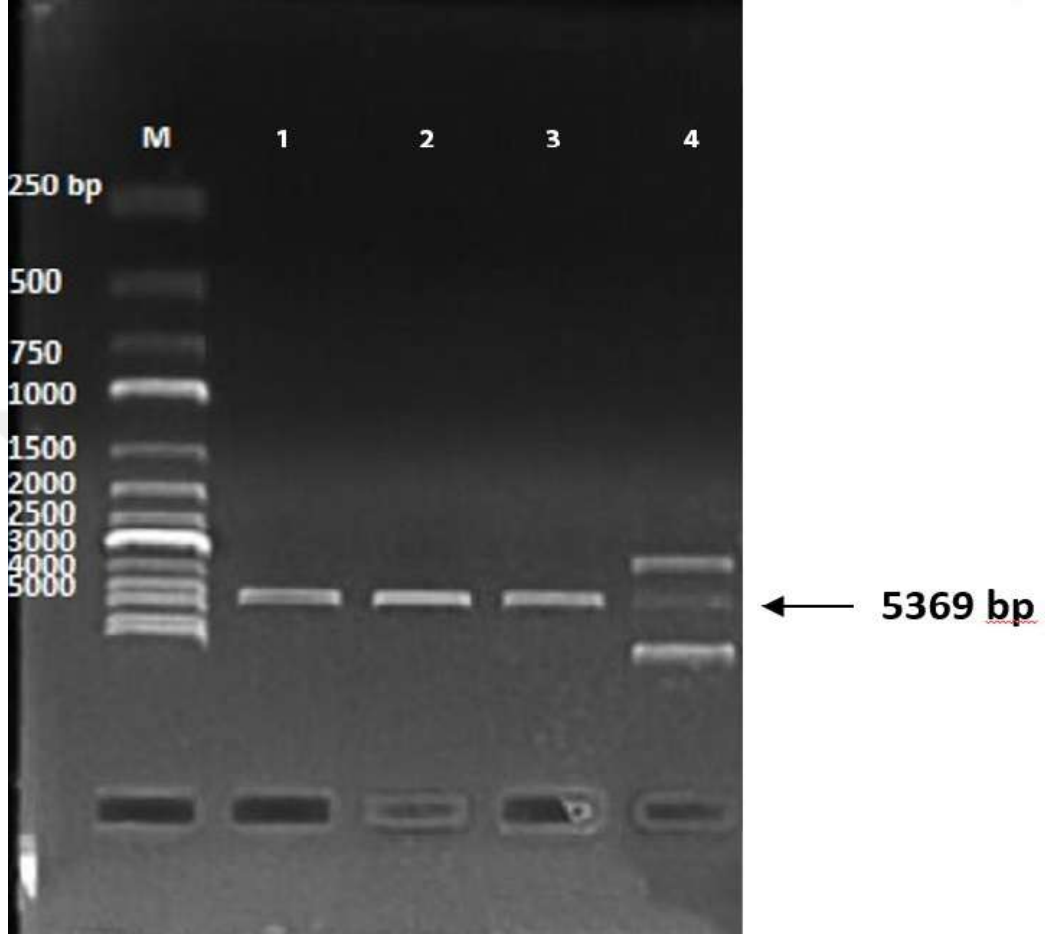


Şekil 10. TmHSP70 primerleriyle çoğaltılmış cDNA'nın PZR görüntüsü. M: Marker (100 bp).

5.3. Plazmid Kontrolü ve İzolasyonu

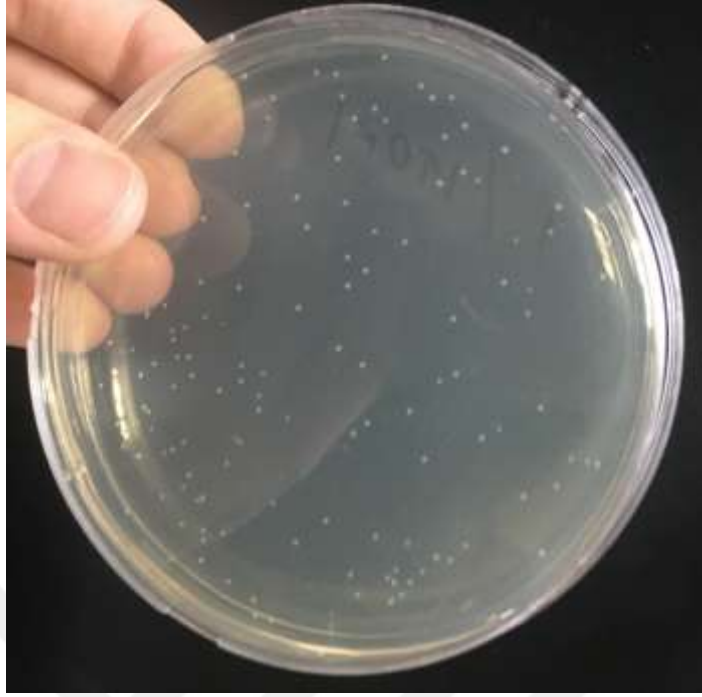
pET-28(a) vektörü ilk olarak enzimlerle kesilmeden %1'lik agaroz jelde yürütülerek gösterildi (Şekil 11). Daha sonra *Xho1* ve *Nde1* enzimleri kullanılarak enzimlerin vektörü kesip kesmediği teyid edildi ve %1'lik agaroz jelde yürütülerek gösterildi (Şekil 11). Yalnızca *Xho1* enzimi ile kesim uygulandığında plazmid linear forma geçeceği ve herhangi bir kayıp olmayacağı için 5369 bp büyüklüğünde bir band görüldü ve enzimin vektörü kestiği doğrulanmış oldu. Yalnızca *Nde1* enzimi ile kesim uygulandığında plazmid linear forma geçeceği ve herhangi bir kayıp olmayacağı için 5369 bp büyüklüğünde bir band görüldü ve enzimin vektörü kestiği doğrulanmış oldu. *Xho1* ve *Nde1* enzimleri ile yapılan ikili kesim sonucunda ise eksilen parça vektör haritasına göre 80 bp büyüklüğünde bir parça olduğu için

jelde görmeyi beklemediğimiz bir büyüklük olup 5369 bp'ye yakın bir band elde edildi.



Şekil 11. pET-28(a) vektörünün PZR kontrol bulguları. 1: Sadece *Xho1* enzimi ile kesim işlemi uygulanmış linear vektör, 2: Sadece *Nde1* enzimi ile kesim işlemi uygulanmış linear vektör, 3: *Xho1* ve *Nde1* enzimleri ile kesim uygulanmış linear vektör, 4: Enzim kesim işlemi uygulanmamış halkasal formdaki vektör. M: Marker (250 bp).

Enzim kesim işlemleri, ligasyon ve transformasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra transformasyon ürününe oda ısısındaki 300 µl SOC medium eklendi ve transformasyon karışımı 37°C'de 1,5 saat inkübe edildikten sonra LB katı besiyerine ekilerek bir gece 37 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün katı besi yerinde koloni oluşumu gözlemlendi (Şekil 12).



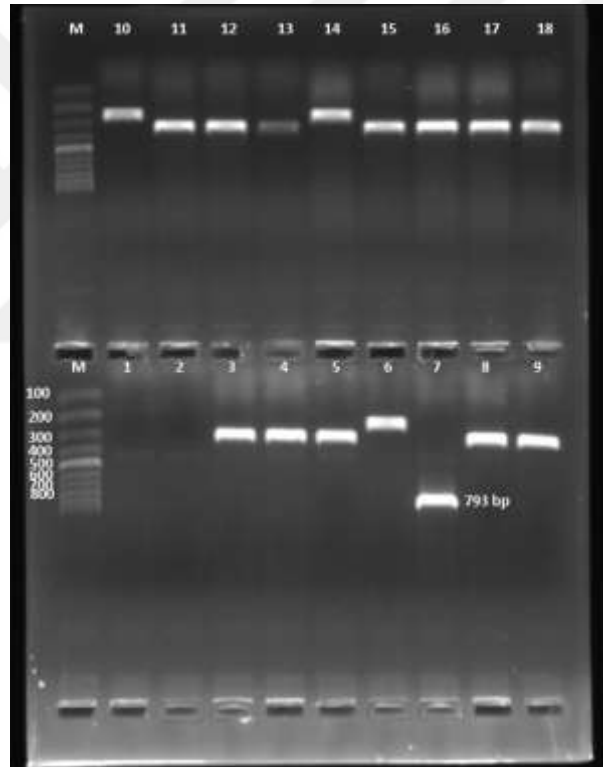
Şekil 12. LB katı besiyerinde oluşan kolonilerin görüntüsü.

LB katı besiyerinde oluşan kolonilerden seçilen tek koloniler, transformasyon etkinliğini artırmak ve hücre iyileşme süreci için steril bir öze yardımı ile alınıp ayrı ayrı tekrar LB katı besiyerine ekildi. Tekrar 37 °C’de bir gece inkübe edilen kolonilerin katı besiyerindeki görünüşleri Şekil 13’te gösterildiği gibidir.



Şekil 13. İkinci kez besiyerine ekimi yapılan kolonilerin görüntüsü.

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plazmidi içerip içermediğini tespit etmek için koloni PZR taraması yapıldı ve pozitif bulunan kolonilerin doğru oryantasyonda bağlandığını tespit etmek amacıyla çapraz PZR işlemleri gerçekleştirildi. Tahmini ürün boyları vektör sekansı ve enzim kesim noktaları dikkate alınarak aradaki 80 bazlık kısım çıkarıldı ve 547 bp büyüklüğündeki insert dizisi eklenerek hesaplamalar yapıldı ve %1,4'lük jelde görüntülendi. Neticede 18 adet koloni tarandı ve yedi nolu koloni (793 bp) pozitif olarak belirlendi (Şekil 14).



Şekil 14. T7 forward-T7 reverse primerleri kullanılarak kurulan koloni PZR tarama sonuçları. 1-18: Besiyerinden alınan farklı kolonilere ait PZR bandları. M: Marker (100 bp).

Yedi numaralı koloni gliserol stoktan Miniprep Kit (Qiagen) ile izole edildikten sonra çapraz PZR işlemleri gerçekleştirildi.

Bu amaçla;

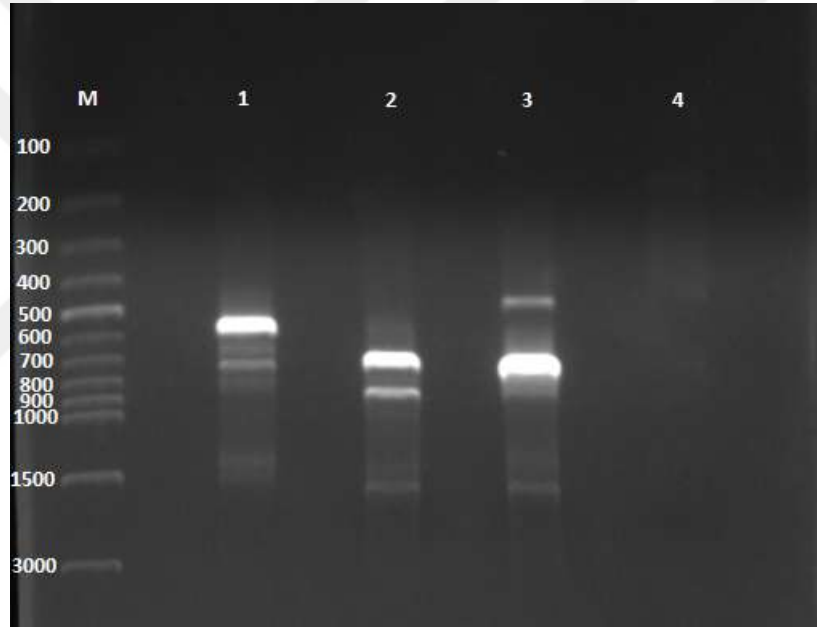
Çapraz PZR 1: TmHSP70 Forward-Reverse primerleri ile (547 bp)

Çapraz PZR 2: TmHSP70 Forward-T7 Reverse primerleri ile (642 bp)

Çapraz PZR 3: T7 Forward-TmHSP70 Reverse primerleri ile (698 bp)

Çapraz PZR 4: T7 Reverse-TmHSP70 Reverse primerleri ile (band beklenmemektedir).

Reaksiyonlar kurularak %1,4'lük agaroz jelde gösterildi (Şekil 15).



Şekil 15. Çapraz PZR işlemi sonucunda elde edilen band büyüklükleri. 1: 547 bp, 2: 642 bp, 3: 698 bp, 4: band beklenmiyor. M: Marker (100 bp).

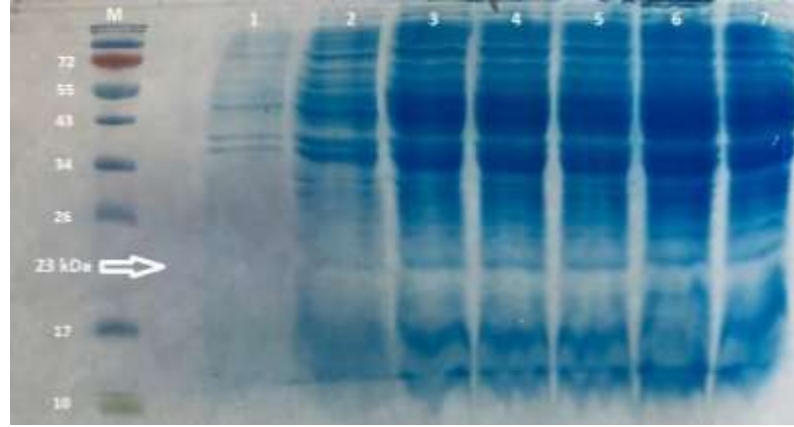
Çapraz PZR işlemlerinin yanısıra PZR ürünleri sekans analizi için ticari firmaya (İontek, İstanbul) gönderildi ve klonlama işlemi bir kez daha doğrulandı (Şekil 16). Nükleotid dizisi protein dizisine çevrilerek ORF analizleri gerçekleştirildi ve Şekil 17’de gösterildi. Protein dizisine ait benzerlik analizleri yapıldı ve benzerlik oranları Şekil 18’de gösterildi.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
✓	unnamed protein product (Tetrahymena axelae)	342	342	96%	4e-112	92.31%	VOK32707.1
✓	conserved hypothetical protein (Echinococcus multilocularis)	284	284	98%	1e-81	75.69%	Q1579458.1
✓	unnamed protein product (Hyalobrotia leucogaster)	258	258	96%	4e-80	69.23%	VOM30366.1
✓	hypothetical protein Eps2_000618100 (Echinococcus granulosus)	258	258	98%	6e-80	74.59%	Q1523972.1
✓	Tubby protein (Echinococcus granulosus)	261	261	98%	1e-77	74.59%	XP_024352653.1
✓	unnamed protein product (Mnaccostolus cori)	198	198	99%	5e-56	56.04%	VOK75485.1
✓	unnamed protein product (Hymanobolus dimorpha)	178	178	97%	4e-46	52.81%	VOK57311.1
✓	unnamed protein product (Hodotrichia nana)	167	167	97%	6e-46	52.25%	VOM67944.1
✓	hypothetical protein EG68_06240 (Paragonimus mexicanus)	79.7	79.7	77%	1e-13	31.47%	KAF713733.1
✓	unnamed protein product (Schistosoma matheei)	77.8	77.8	84%	7e-13	31.68%	VOP72631.1
✓	uncharacterized protein DCE41_0211108 (Schistosoma bovis)	77.8	77.8	83%	7e-13	32.88%	RT088934.1
✓	unnamed protein product (Schistosoma mansoni)	76.6	76.6	83%	1e-12	32.06%	VOP20867.1
✓	uncharacterized protein MS3_0217593 (Schistosoma haematobium)	76.6	76.6	83%	1e-12	32.88%	XP_012737848.2
✓	hypothetical protein F4Y8X1_00418 (Schistosoma japonicum)	76.3	76.3	79%	1e-12	33.56%	THN15022.1
✓	hypothetical protein FHET_04501 (Paragonimus heterothymus)	75.5	75.5	77%	3e-12	30.77%	KAF5411867.1
✓	unnamed protein product (Tidichthys leucis)	73.6	73.6	87%	2e-11	30.54%	VOK45136.1
✓	hypothetical protein Jima_075450 (Schistosoma mansoni)	73.2	73.2	86%	2e-11	31.55%	XP_010646646.1
✓	unnamed protein product (Schistosoma volucre)	57.8	57.8	55%	2e-06	35.24%	VOK45888.1
✓	hypothetical protein FR46_05495 (Fasciola hepatica)	53.1	53.1	45%	1e-04	34.12%	KAA2190395.1
✓	hypothetical protein D418_034688 (Fasciola hepatica)	50.4	50.4	36%	0.001	37.31%	THD24456.1
✓	hypothetical protein FG5G_00379 (Fasciola gigantica)	50.4	50.4	36%	0.001	37.31%	TTP55458.1
✓	unnamed protein product (Schistosoma capensis)	50.1	50.1	68%	0.001	28.12%	VOP90432.1

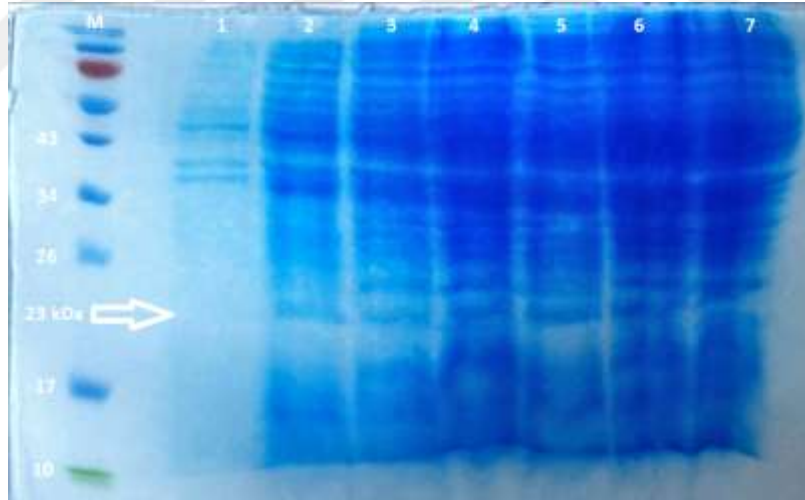
Şekil 18. TmHSP70 protein dizisine ait Protein BLAST analiz sonucu ve benzerlik oranları.

5.4. Pilot Ekspresyon Denemeleri

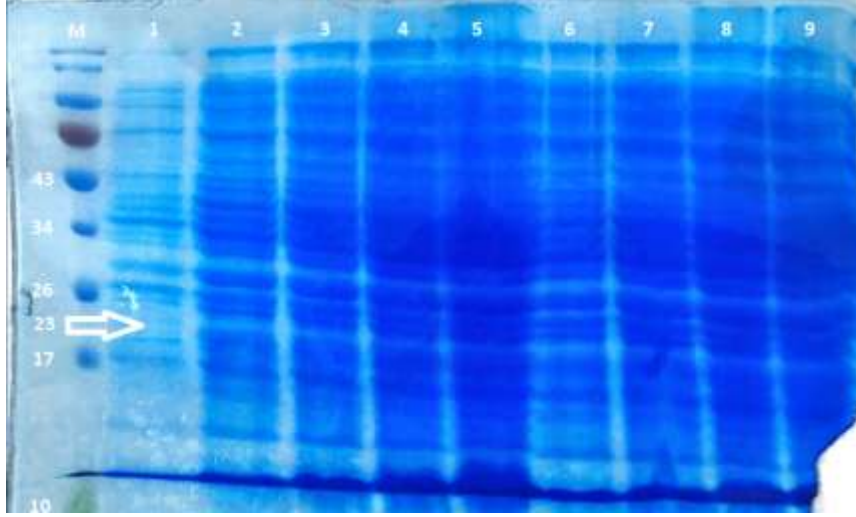
IPTG optimizasyonu yapılırken 0,01; 0,1; 0,5; 1 ve 2 mM olmak üzere çeşitli IPTG miktarları denenmiş ve 0-5 saat aralığında her saat örnek alınarak aynı zamanda optimum indükleme saati de belirlenmiştir. Ekspresyon seviyeleri karşılaştırmalı olarak SDS-PAGE analizi ile gösterilmiştir (Şekil 19, 20, 21).



Şekil 19. Farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin SDS-PAGE analizi görüntüsü. 1: Negatif kontrol (*E. coli* DH5α), 2: 0. saat, 3: 0,01 mM IPTG indükleme 3. saat, 4: 0,1 mM IPTG indükleme 3. saat, 5: 0,5 mM IPTG indükleme 3. saat, 6: 1 mM IPTG indükleme 3. saat, 7: 2 mM IPTG indükleme 3. saat, M: Prestained protein markeri.



Şekil 20. 0,5 mM IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin SDS-PAGE analizi görüntüsü. 1: Negatif kontrol (*E. coli* DH5α), 2: 0. Saat, 3: 1. saat, 4: 2. saat, 5: 3. saat, 6: 4. saat, 7: 5. saat, M: Prestained protein markeri.



Şekil 21. Farklı IPTG oranlarıyla yapılan indüklemelerin saatlere göre protein ekspresyon seviyesine etkisi ve örneklerin SDS-PAGE analizi görüntüsü. 1: Negatif kontrol (*E. coli* DH5 α), 2: 0,1 mM IPTG indükleme 1. saat, 3: 0,1 mM IPTG indükleme 2. saat, 4: 0,1 mM IPTG indükleme 4. saat, 5: 0,1 mM IPTG indükleme 5. saat, 6: 1 mM IPTG indükleme 1. saat, 7: 1 mM IPTG indükleme 2. saat, 8: 1 mM IPTG indükleme 4. saat, 9: 1 mM IPTG indükleme 5. Saat, M: Prestained protein markeri.

Pilot ekspresyon çalışmaları sonucunda IPTG ile optimum ekspresyon saati üçüncü saat ve konsantrasyonu ise 0,5 mM olarak belirlendi ve büyük hacimde (500 ml) üretim yapıp takiben rekombinant proteinlerin saflaştırılması aşamasına geçildi.

5.5. Rekombinant Protein Pürifikasyonu ve SDS-PAGE Bulguları

Rekombinant TmHSP70 proteininin nükleotid ve aminoasit dizilimleri belirlendikten sonra proteinin tahmini molekül ağırlığı ExPASy programı ile hesaplandı. Bu hesaplama sonucunda 23 kDa ağırlığında bir protein beklendiği öngörüldü.

HisPur™ Ni-NTA Spin Purification Kit (Thermo) önerileri doğrultusunda protein pürifikasyon işlemi gerçekleştirildi ve SDS-PAGE analizi ile gösterildi (Şekil 22).



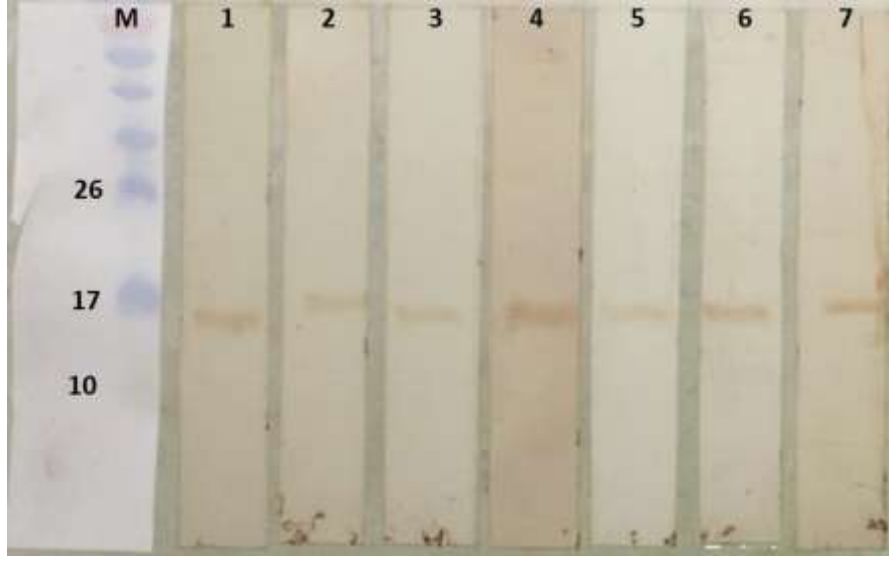
Şekil 22. Pürifikasyon işlemi sonrasında elde edilen rekombinant TmHSP70 proteininin (23 kDa) SDS-PAGE jel görüntüsü, M: Prestained protein markeri.

5.6. Western Blot Bulguları

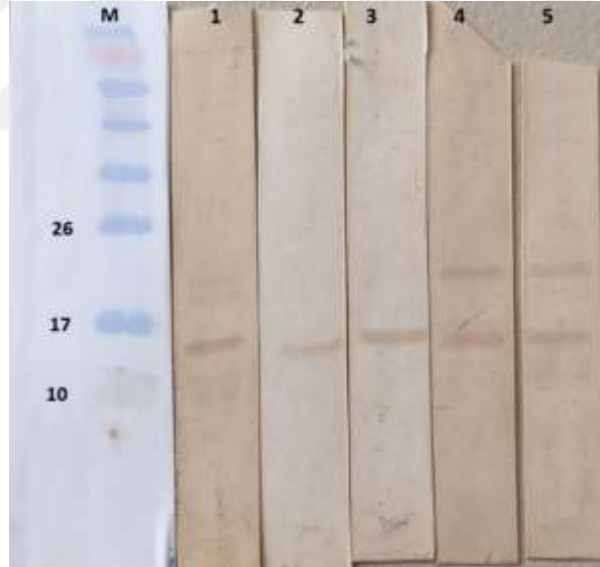
Pürifiye edilen rekombinant proteinin pozitif ve negatif koyun serumlarıyla verdiği yanıtlar western blot ile gösterildi. Çapraz reaksiyon kontrolü amacıyla hidatik kist ve *D. dendriticum* pozitif koyun serumları da western blot analizinde kullanıldı. Elde edilen pürifiye protein ve western blot analiz sonuçları Şekil 23, 24 ve 25'te gösterildiği gibidir.



Şekil 23. *Coenurus cerebralis* pozitif koyun serumlarının (1-3) kullanıldığı western blot bulguları, M: Prestained protein markeri.



Şekil 24. *Coenurus cerebralis* negatif koyun serumlarının (1-7) kullanıldığı western blot bulguları, M: Prestained protein markeri.



Şekil 25. Çapraz reaksiyonların değerlendirildiği western blot analizi. 1: Hidatik kistli koyun serumu, 2: *Dicrocoelium dendriticum* pozitif koyun serumu, 3: Negatif kontrol kuzu serumu, 4-5: *Coenurus cerebralis* pozitif kontrol koyun serumları, M: Prestained protein markeri.

Şekil 21’de görüldüğü üzere rekombinant pürifiye TmHSP70 kullanılarak sadece *C. cerebralis* pozitif serumların işlendiği western blot analizinde hem 23 kDa hem de 17 kDa’luk iki band gözlenmiştir. Öte yandan, negatif koyun serumlarının kullanıldığı western blot analizinde sadece 17 kDa’luk bir band elde edilmiştir (Şekil 22). Bu da diagnostik bandın 23 kDa olduğunu göstermektedir. Şekil 23’de ise çapraz reaksiyon kontrolünün yapıldığı western blot analizi neticesinde elde edilen bandlar gösterilmiştir. Buna göre, *D. dendriticum* (2 nolu strip) ve negatif kontrol (3 nolu strip) serumda sadece 17 kDa civarında band gözlenirken, hidatik kist (1 nolu strip) ve *C. cerebralis* pozitif serumlarda (4-5 nolu stripler) 23 kDa ve 17 kDa’luk bandlar gözlenmiştir.

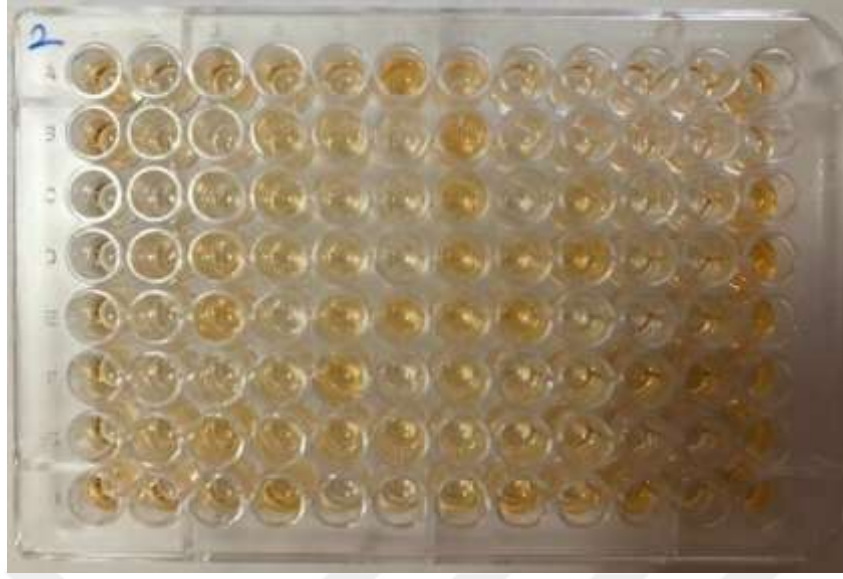
5.7. ELISA ve Western Blot Testlerinin Sensitivite ve Spesifite Oranları

Western blot ve ELISA testlerinin sensitivite-spesifite oranlarının belirlenmesinde nekropsi sonrası takibi yapılan ve *C. cerebralis* teşhisi konulan altı adet koyundan elde edilen kesin pozitif serumlar kullanıldı. Western blot test sonucuna göre kullanılan altı serumun altısı da pozitif sonuç verirken ELISA test sonuçlarına göre altı serumun dörtü pozitif yanıt verdi. Bunun yanı sıra enfekte olduğundan şüphelenilen koyun bulunan sürülerden klinik belirti gösteren hayvanlar seçilerek 17 serum daha hem ELISA hem de western blot ile test edildi. Bu 17 serumun western blot analizi sonucunda hepsi negatif olarak belirlenirken ELISA test sonuçlarına göre 13’ü pozitif olarak belirlendi. Antijenin spesifite oranlarını belirlemek için yeni doğmuş kuzulardan alınan 19 negatif serumun western blot analizi sonucuna göre tamamı negatif yanıt verirken, ELISA test sonuçlarına göre sadece 10’u negatif yanıt verdi. Çapraz reaksiyon kontrolü

amacıyla bir adet hidatik kist ve bir adet *D. dendriticum* pozitif koyun serumu da western blot analizinde kullanıldı ve *D. dendriticum* negatif olarak değerlendirilirken, hidatik kist pozitif olarak değerlendirildi. Böylelikle rekombinant TmHSP70 antijeninin western blot testindeki sensitivite ve spesifitesi %100 olarak belirlenirken saha şartlarında hidatik kist ile enfekte koyunlarda yanlış pozitiflikler gözlenebileceği için spesifite oranının düşebileceği öngörülmektedir. Öte yandan rekombinant TmHSP70 antijeni kullanılarak yapılan ELISA'da sensitivite ve spesifite değerleri sırasıyla %66,6 ve %52,6 olarak belirlendi.

5.8. ELISA Bulguları

Öncelikle kesin pozitif ve negatif serumlar kullanılarak rekombinant TmHSP70 antijeninin sensitivite ve spesifite değerleri hesaplandı. Takiben sahadan toplanan örneklerin ELISA ile işlenmesine geçildi ve neticede cut-off değerinin üzerindeki sonuçlar pozitif, altındaki değerler ise negatif olarak değerlendirildi. Buna göre, işlenen toplam 1207 serum örneğinin %46.97'si ELISA ile pozitif sonuç verdi. ELISA pleytlerinden birinin görüntüsü Şekil 26'da gösterilmiştir. Çapraz reaksiyonların kontrolü amacıyla bir adet hidatik kist pozitif koyun serumu kullanıldı ve pozitif olarak değerlendirildi. Yapılan ELISA testi neticesinde kullanılan serumlardan 12 tanesi pozitif yanıt verdi.



Şekil 26. Substrat ve durdurma solüsyonu eklenmiş ELISA pleyt görüntüsü.

ELISA testi absorbands değeri sonuçlarına göre yüksek pozitiflik veren, sınır değerde kalan ve negatif olarak değerlendirilen 26 serum örneği rastgele seçilerek western blot ile test edildi. Tekrarlanan bu işlemin sonucu Tablo 13’de gösterildi.

Tablo 13. Sahadan toplanan serumların ELISA sonuçlarına göre rastgele seçilenlerinin western blot testi sonuçları.

Serum Numarası	ELISA Sonucu	Western Blot Sonucu
P-1	(+)	(+)
N-1	(-)	(-)
C-27	(+)	(+)
C-26	(+)	(-)
T-101	(+)	(-)
T-109	(+)	(+)
T-79	(+)	(-)
K-9	(+)	(+)
S-4	(+)	(+)
S-35	(+)	(+)
S-66	(-)	(+)
S-115	(+)	(-)
S-219	(-)	(+)
S-229	(+)	(+)
K-13	(+)	(+)
Z-19	(-)	(+)
Z-126	(-)	(+)
K-12	(+)	(+)
Y-54	(+)	(+)
Y-89	(+)	(-)
Y-95	(+)	(-)
Y-97	(+)	(-)
Y-118	(+)	(-)
Y-131	(+)	(-)
Y-167	(+)	(-)
Y-193	(+)	(-)

Kontrol amaçlı yapılan western blot neticesinde ELISA ile pozitif bulunan 21 örneğin 14'ü western blot ile pozitif bulundu. İlginç bir şekilde ELISA ile negatif bulunan beş örneğin dörtü western blot ile negatif bulunurken, ELISA ile sınır değerde pozitif olarak değerlendirilen altı örneğin hepsi de western blot ile negatif bulundu.

6. TARTIŞMA

Coenurosis ilk olarak 17. yüzyıl literatürlerinde incelenmiş, ancak daha eski belgeler incelendiğinde coenurosis benzeri klinik belirtilerin görüldüğü sinir sistemi hastalıklarının Hipokrat dönemine kadar dayandığı görülmektedir (17). Enfeksiyon ağırlıklı olarak meraya çıkan koyun ve keçiler ile çoban köpekleri arasında geçmektedir (22).

Türkiye’de coenurosisin koyunlardaki yaygınlığına yönelik yapılan çalışmalarda hastalığın prevalans oranının hayvanların yaşına, yetiştirildikleri bölgeye ve meraya çıkma durumlarına göre değişmekle birlikte %1,2 ile %64,7 arasında değiştiği rapor edilmiştir (40, 42). Hastalığın keçilerdeki yaygınlığının daha düşük olması beklenmesine rağmen çok az sayıdaki çalışmanın birinde Tınar (120), keçilerde coenurosisin yaygınlığının %15 olduğunu bildirmiştir. Sığırlarda yapılan prevalans çalışmaları sayıca sınırlı olup, prevalans oranlarının koyunlara kıyasla oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu çalışmalarda sığırlardaki yaygınlığın %0,47 ile %1,3 arasında değiştiği ifade edilmiştir (56, 121). Görüldüğü üzere Türkiye’de coenurosis koyunlarda daha yaygın olarak görülmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında koyun coenurosisinin tanısına yönelik rekombinant bir protein elde edilmesi planlanmıştır.

Hastalığın teşhisi, klinik görünüm, nörolojik muayene, nekropsi ve ölüm sonrası muayeneye dayanmaktadır. Her ne kadar klinik belirti ve kist yerleşimlerinin korelasyonu az gelişmiş olsa da klinik belirtilerin yorumlanması en iyi tanı yöntemidir. Coenurosis genellikle klinik muayene protokolüne dayanarak

teşhis edilir ve bunun yanında radyoloji, USG ve BT gibi deneysel durumlarda kullanılan görüntüleme yöntemleri de kullanılabilir (44).

Ultrasonografi (USG) ile coenurosis teşhisi yapılması amaçlanan bir çalışmada 9 koyun ve 3 keçi US ile muayene edilmiş ve 11 hayvanda kistin teşhisi başarılı bir şekilde yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda küçükbaş hayvanlarda kronik coenurosis teşhisinde uygun maliyetli, kolay ve etkili bir tanı yöntemi olarak USG'nin kullanılabileceği belirtilmiştir (63).

Görüntüleme yöntemlerini kullanan başka bir çalışmada ise BT ile coenurosisin teşhisinin yapılması amaçlanmıştır. Sonuç olarak doğal enfekte hayvanlarda coenurosis teşhisinde ilk kez BT başarılı bir şekilde kullanılmıştır (64).

Coenurosisin teşhisine yönelik kullanılan görüntüleme yöntemlerine ek olarak aşırı duyarlılık deri testi, indirekt hemaglutinasyon testi, jel-double difüzyon, ELISA testleri gibi deneysel yöntemler de kullanılmıştır (44). Teşhis amaçlı kullanılan tüm bu yöntemler başarılı olarak kabul edilse de hala kesin tanıda en başarılı yöntemin nekropsi olduğu rapor edilmektedir (26).

Polimeraz zincir reaksiyonu gibi moleküler yöntemler ise doğal ve deneysel olarak enfekte olmuş koyun ve keçilerdeki serebral kistlerin teyidinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Doğal ve deneysel olarak enfekte olmuş koyun ve keçi izolatlarının CO1 ve NAD1 gen bölgelerinin amplifiye edilmesi ve sekans analizlerinin yapılmasıyla, her iki mitokondriyal gen bölgesine ait dizinin de köpeklerden elde edilen erişkin *T. multiceps* ile %100 benzer olduğu ortaya konulmuştur (16).

Yapılan başka bir çalışmada, köpeklerde klasik-PZR ile araştırmacılar tarafından optimize edilen direkt PZR yöntemi karşılaştırılmış ve sonuç olarak klasik PZR ile %78,6, direkt PZR ile ise %85,7 oranında pozitiflik elde edilmiştir. Çalışma sonucunda direkt PZR yönteminin *T. multiceps* olgularını tanımlamak için bir araç olabileceği belirtilmiştir (65).

Görüntüleme yöntemlerinin coenurosis tanısındaki avantajlarının yanısıra birtakım dezavantajları da bulunmaktadır. Özellikle görüntülenen kistik yapıların başta hidatik kist ve basit kistik lezyonlar olmak üzere diğer kistik yapılarla karıştırılabilmesi, yeni gelişmekte olan kistlerin gözden kaçabilmesi ve en önemlisi de saha şartlarında bu görüntüleme yöntemlerinin uygulama zorlukları nedeniyle pek tercih edilememektedir. Yine PZR gibi moleküler yöntemler özellikle nekropsi sonrası elde edilen kistlerin teyid edilmesi için sekans öncesi bir ara basamak olup, canlı hayvanlarda ve sürü bazlı tanıda yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle daha fazla hayvanı tarayabilecek, uygulaması kolay ve düşük maliyetli serolojik tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Buradan hareketle bu tez çalışması planlanmıştır.

Serolojik yöntemlerin coenurosis'in teşhisinde kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Bu amaçla yapılan bir çalışmada *C. cerebralis*'e ait ham antijen (0.85 mg/ml) kullanılarak Dot immunogold filtration assay (DIGFA) yöntemi ile teşhis denenmiş ancak sonuçlar teşhis için yeterli olmamıştır (70).

Tanısal antijen olarak ham antijenlerin kullanılması, seri üretim aşamasına dengesiz termal stabilite gösterdikleri için ham antijen kullanılan çalışmalar çok ileri gidememiştir. Sonuç olarak, rekombinant antijenlere dayanan ELISA

deneylerine yönelim artmış ve paraziter hastalıkları teşhis etmek için giderek daha fazla kullanılmaya başlanmıştır (122).

Tm-P2, Tm-HSP70, Tm-GP50, Tm-GST ve Tm-HSP60 gibi rekombinant proteinlerin kullanıldığı ELISA metodları oluşturulmuş ve teşhis antijenleri olarak kullanılmıştır (71, 72, 74, 118).

Coenurosis'in erken dönem tanısı amacıyla *T. multiceps*'in transkriptomundan GP50'yi (TmGP50) kodlayan bir cDNA tanımlanmış, klonlanmış ve *E. coli*'de eksprese edilmiştir. Rekombinant TmGP50 proteini kullanılarak dizayn edilen indirekt ELISA sonuçlarına göre protein %95 sensitivite ve %92,6 spesifite sergilemiştir. Bu çalışmada deneysel olarak enfekte edilen keçilerde TmGP50 antikoru 2 ila 17 hafta arasında tespit edilirken, kontrol grubunda ise antikorun praziquantel tedavisinden yaklaşık 3 hafta sonra eşik değerin altına düştüğü gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonucunda rekombinant TmGP50'nin keçilerde coenurosis için uygun bir erken tanı antijeni olduğu ifade edilmiştir (72).

Yapılan başka bir çalışmada bir HSP olan Tm-HSP70 kullanılarak dizayn edilen indirekt ELISA (iELISA) yöntemiyle *T. multiceps* enfeksiyonlarının serolojik teşhisinin yapılması amaçlanmıştır. Nekropsi sonucunda elde edilen kistlerin protoskolekslerinden izole edilen rekombinant proteinin (34 kDa) coenurosis pozitif keçi serumu ile pozitif yanıt verdiği belirtilmiştir. TmHSP70 proteininin ELISA testi sonuçlarına göre yüksek spesifite ve %83,3 (5/6) sensitivite oranının olduğu bildirilmiştir. 30 enfekte keçide *T. multiceps* enfeksiyonunu doğru bir şekilde doğruladığı ve bu proteinin kullanıldığı indirekt ELISA testinin coenurosis teşhisi için hızlı bir tanı testi olabileceği bildirilmiştir (118).

Hücresel korumanın en ilkel mekanizması, HSP ailesi ve bu ailede bulunan proteinlerin ekspresyonunu içermektedir. HSP'ler, hipertermi, serbest oksijen radikalleri, ağır metaller gibi bazı stres koşullarına yanıt olarak ifade edilmektedir. Bu proteinlerin eksprese olduğu stres durumlarının hepsinin ortak noktası, proteinlerin üçüncül yapısını bozmaları ve hücresel metabolizma üzerinde olumsuz etkilere sahip olmalarıdır. HSP'lerin hücreleri korumasında, zararlı çevre koşulları ve patojenlerle mücadelede doğal bir organ koruma mekanizması olarak potansiyel önemi vardır (123). HSP'ler parazitlerin yaşam süreçlerinde son derece önemli bir rol oynamakta ve bu etkileri genellikle parazite ait yaşam dönemlerinin çoğunda devam etmektedir. Parazitlerin şiddetli hipoksi ve sıcaklık değişiklikleri gibi çeşitli çevresel zorluklarla başa çıkması gerekmektedir. Aynı zamanda parazit HSP'leri bir yandan memeli konakçıya adaptasyonda, parazitin yaşam dönemlerinin farklılaşmasında ve enfektivitesinde önemli roller oynarlarken, diğer yandan belirgin antijenik proteinler olarak da işlev görmektedirler (124).

Molekül ağırlığı 70 kDa (HSP70) olan HSP'ler, geniş parazit spektrumunda bağışıklık sistemi tarafından tanınan dominant antijenler olarak tanımlanmıştır. (118). Bununla birlikte Colebrook ve Lightowlers (1997), *E. granulosus* HSP70 (EgHSP70) proteinleri ile spesifik antikorları incelemiş ve hidatik kist hastalarının %60'ında, sağlıklı kontrol grubunun ise %20'sinde bulunduğunu ve bu nedenle, konakçı-patojen etkileşimlerinde, patojenlerin stres proteinlerinin immünolojik öneme sahip olduğunu belirtmişlerdir (117).

Taenia multiceps de diğer tüm parazitlerde olduğu gibi yaşam döngüsünü tamamlaması esnasında pek çok çevresel ve konakçıya ait engellere maruz kalmaktadır. Bu zorlu yaşam koşullarına yanıt olarak, parazit HSP'lerinin önemli

bir rol oynayabileceği belirtilmiştir (125). Aynı zamanda moleküler şaperon aktivitelerine ek olarak HSP'lerin parazitlerin büyümesi ve gelişmesinde rol oynadıkları ve konakçı vücudunda geçirdiği dönemde önemli bir antijen olarak konakçı bağışıklık sistemi tarafından tanınabildiği bildirilmiştir (126). Bu nedenle bu tez çalışmasında tanı amacıyla kullanılacak protein için HSP ailesinden HSP70 gen bölgesi seçildi.

Çalışmada öncelikle koyun kökenli *T. multiceps* HSP70 geni izole edilerek PZR ile çoğaltılıp klonlandıktan sonra eksprese edilip rekombinant TmHSP70 proteini elde edildi. Bahsi geçen rekombinant protein dünyada ve ülkemizde ilk kez izole edilip koyun coenurosisinin tanısındaki etkinliği araştırıldı. Neticede, western blot analizinin sensitivite ve spesifite değerleri %100 olarak belirlenirken ELISA testinin sensitivite ve spesifite oranları sırasıyla %66,6 ve %52,6 olarak belirlendi. Aynı zamanda bakısı yapılan 1207 serum örneğinin 567 (%46,97)'si ELISA ile pozitif olarak bulundu. Bu araştırmada testler arasındaki ikili karşılaştırmalar sonucunda elde edilen doğruluk oranlarına bakıldığında, ELISA testinin sensitivite ve spesifite değerlerinin western blot testine kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun sebebi western blot testinde hem pozitif hem de negatif serumlarda gözlenen 17 kDa'luk bandın ELISA testinde bir arka plan oluşturması ve OD değerlerinin yüksek çıkmasına yol açarak yanlış yorumlamalara yol açması olabilir.

Wang ve ark. (118)'nin yaptığı bir çalışmada rekombinant Tm-HSP70 temelli dizayn edilen ELISA testinin serodiyagnostik özelliği araştırılmıştır ve antijenin 30 enfekte ve 30 da enfekte olmayan keçi serumundaki sensitivite ve spesifite değerlerinin %100 olduğu ifade edilmiştir. Çapraz reaksiyonların

değerlendirilmesi amacıyla ise 6 adet *Cysticercus teniuollis* ile enfekte keçi serumu kullanılmış ve 5 tanesinin pozitif olarak değerlendirildiği (%83,3) belirtilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda rekombinant protein temelli dizayn edilen ELISA testinin keçilerdeki *C. cerebralis* enfeksiyonlarını teşhis etmek için etkili ve güvenilir bir araç olduğu belirtilmiştir.

Bizim çalışmamızda ise western blot ve ELISA testlerinin sensitivite-spesifite oranlarını belirlemek için nekropsi ile *C. cerebralis* teşhisi konulan 6 adet koyundan elde edilen kesin pozitif serumlar kullanıldı. Western blot test sonucuna göre kullanılan 6 serumun 6'sı da pozitif sonuç (%100) verirken ELISA test sonuçlarına göre 6 serumun 4'ü (%66,6) pozitif yanıt verdi. Antijenin spesifite oranlarını belirlemek için yeni doğmuş kuzulardan alınan 19 negatif serumun western blot analizi sonucuna göre tamamı (%100) negatif yanıt verirken, ELISA test sonucunda 10'u (%52,6) negatif yanıt verdi. Wang ve ark (2015), keçilerde ELISA testi ile %100 sensitivite ve spesifite elde ederlerken bu tez çalışmasında ELISA testinin sensitivite ve spesifite değerleri sırasıyla %66,6 ve %52,6 olarak belirlenmiştir. Bu farklılık pozitif olarak kullanılan serumların alındığı hayvanlardaki bireysel antikor titresi, kist büyüklüğü ve başka parazitler enfeksiyonların varlığı ile açıklanabilir.

Taenia multiceps'in arakonaklardaki tanısıyla ilgili üretilen rekombinant proteinler sadece HSP kökenli olmayıp başka gen bölgelerinin de kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada *T. multiceps*'in antijen B (AgB) ve tioredoksin peroksidaz (TPx) genleri klonlanmış ve erken dönem teşhis yetenekleri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre rTm-AgB %95,8'lik bir sensitivite

ve %87,5'lik bir spesifite göstermiş ve coenurosisin teşhisi için güçlü bir aday olabileceği belirtilmiştir (71).

Taenia multiceps'in transkriptomundan laktat dehidrojenaz A (Tm-LDHA) ve B'yi (Tm-LDHB) kodlayan genler konlanmış ve rekombinant Tm-LDHB proteini (rTm-LDHB) üretilmiştir. Elde edilen bu proteinin keçilerde *T. multiceps*'in serolojik tanısal potansiyelinin değerlendirilmesi için geliştirilen ELISA testi sonuçlarına göre, *T. multiceps* ile enfekte edilen keçilerin saptanmasında %71,42 (10/14) spesifite sergilemiştir. Bu sonuçlar neticesinde rTm-LDHB'nin keçilerdeki *T. multiceps* enfeksiyonunun serodiyagnozu için spesifik bir antijen adayı olmadığı belirtilmiştir (73).

Tanısal amaçlı yapılan bir diğer çalışmada, *C. cerebralis*'in total RNA'sından glutatyon S-transferaz (GST) geni amplifiye edilmiş ve rekombinant Tm-GST (rTm-GST) proteininin, serumda anti-GST antikorlarını saptama yeteneği araştırılmış ve %92,8 (13/14) spesifite ve %90 (18/20) sensitivite oranları belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda Tm-GST'nin coenurosisin erken dönem teşhisinde kullanılma potansiyelinin olduğu belirtilmiştir (74).

Taenia multiceps GP50 proteininin kullanıldığı ve klasik teşhis yöntemi olan nekropsi ile kıyaslandığı bir çalışmada yüksek sensitivite (%95) ve spesifite (%92,6) değerleri bildirilmiştir (72).

Sonuç olarak, bu çalışma ile koyunlarda *T. multiceps* HSP70 geni ilk defa klonlandı ve protein ekspresyonu yapıldı. Bu konuyla ilgili ülkemizde henüz benzer bir çalışma yapılmadığından dolayı elde edilen verilerin literatürdeki önemli bir eksikliği gidereceği öngörülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen veriler *C. cerebralis*'in teşhisi amacıyla rekombinant TmHSP70 antijeninin ELISA'daki kullanımının yeterli tanısallığı doğruluğa ulaşamadığını göstermiştir. Western blot ile elde edilen 17 kDa'luk bandın ELISA testinde yanlış pozitifliklere sebep olabileceği, bu nedenle sensitivite ve spesifite değerleri düşük olan ELISA testinden ziyade %100' yakın sensitivite ve spesifiteye sahip olan western blot temelli tanı kitlerinin geliştirilmesinin daha uygun olacağı düşünülmüştür. Çapraz reaksiyonların değerlendirildiği ELISA testinde hidatik kistli koyun serumlarında da değişik oranlarda pozitiflik belirlenirken, western blot testinde de hidatik kistli koyun serumunda zayıf da olsa pozitif yanıt elde edilmiştir. Bu durum, yapılan protein BLAST analizi neticesinde, TmHSP70 proteininin %74.59 oranında *Echinococcus granulosus* Tuby proteini ile benzerlik göstermesi ile açıklanabilir.

Bu tez çalışması ile ülkemizde ve dünyada koyun yetiştiriciliğinde önemli bir ekonomik problem olan koyun coenurosisinin tanısına yönelik bir kit geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ülkemizde ilk defa rekombinant temelli TmHSP70 proteini üretilmiş ve western blot ve ELISA'daki kullanılabilirliği analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular, rekombinant TmHSP70'in koyun coenurosisinin tanısında western blot testi kullanıldığında oldukça umut verici olduğunu göstermiştir. Bu haliyle tez çalışması amacına ulaşmıştır. Bu aşamadan sonra daha fazla sayıda kesin coenurosis olduğu bilinen koyun serumu ve daha fazla sayıda hidatik kist pozitif koyun serumu kullanılarak testin tekrarlanabilirliğinin teyid edilmesi faydalı olacaktır. Yine deneysel enfeksiyon yapılan koyunlarda erken tanı süresi belirlenerek sahada pratik kullanımı olan dip-stick tanı kitlerinin üretilmesi

mümkün olabilecektir. Böylelikle hastalığın erken dönemli tanısı yapılarak ilaç tedavisi başlanıp, ekonomik kayıpların önüne geçilebilecektir.



7. KAYNAKLAR

1. Rosen S, Savinetsky A, Plakht Y, et al. Dung in the desert: preliminary results of the Negev Holocene Ecology Project. *Curr Anthropol* 2005; 46(2): 317-326.
2. Semerci A, Çelik AD. Türkiye’de küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin genel durumu. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 2016; 21(2).
3. Dejene S, Abebe B, Degefu H. Study on the major health problems that causes carcass and organs condemnation at Hashim’s Export Abattoir, Debrezeit, Ethiopia. *Glob Vet* 2013; 11(4): 362-371.
4. Gadahi J, Arshed M, Ali Q, Javaid S, Shah S. Prevalence of gastrointestinal parasites of sheep and goat in and around Rawalpindi and Islamabad, Pakistan. *Vet World* 2009; 2(2): 51.
5. Sabbatani S, Zucchelli M, Calbucci F, Roncaroli F, Chiodo F. A case of cerebral coenurosis. *Infez Med* 2004; 12(3): 205-210.
6. Tınar R. Cestod larvalarının insan ve hayvan sağlığı açısından önemi ve neden oldukları ekonomik kayıplar. *Türk Veteriner Hekimler Derneği Dergisi* 1979; 49: 32-40.
7. Scala A, Cancedda GM, Varcasia A, et al. A survey of *Taenia multiceps* coenurosis in Sardinian sheep. *Vet Parasitol* 2007; 143(3-4): 294-298.
8. Oryan A, Akbari M, Moazeni M, Amrabadi O. Cerebral and non-cerebral coenurosis in small ruminants. *Trop Biomed* 2014; 31(1): 1-16.
9. Monnig H. *Veterinary Helminthology and Entomology*. 3rd. Edition, Bailliere, Tindall & Cox London, 1950.
10. Taylor M, Coop R, Wall R. *Text Book of Veterinary Parasitology*. 3rd Edition Blackwell Publishing Ltd. Oxford: U. K, 2007.
11. Mandal S. *Veterinary Parasitology at a Glance: International Book Distributing Company: Lucknow, 2006*.
12. Oge H, Oge S, Gonenc B, Ozbakis G, Asti C. Coenurosis in the lumbar region of a goat: A case report. *Vet Med* 2012; 57(6).
13. Abera S, Wubit T, Nejash A. Cerebral coenurosis in small ruminants: A review. *J Anim Sci Adv* 2016; 6(3): 1595-1608.
14. Sharma D, Chauhan P. Coenurosis status in Afro-Asian region: A review. *Small Rumin Res* 2006; 64(3): 197-202.
15. Lescano AG, Zunt J. Other cestodes: Sparganosis, coenurosis and *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Handb Clin Neurol* 2013; 114: 335-345.

16. Oryan A, Moazeni M, Amrabadi O, Akbari M, Sharifiyazdi H. Comparison of distribution pattern, pathogenesis and molecular characteristics of larval stages of *Taenia multiceps* in sheep and goats. *Small Rum Res* 2015; 132: 44-49.
17. Godara R, Katoch R, Yadav A, Khajuria J, Borkataki S. Coenurosis in small ruminants: An overview. *Vet Pract* 2011; 12(1): 102-105.
18. El-Din MMM. The significance of subarachnoid cerebrospinal fluids (CSF) in the development of metacestode of *Coenuruscerebralis* in sheep with reference to its pathological effect. *Glob Vet* 2010; 4(4): 343-348.
19. Nourani H, Kheirabadi KP. Cerebral coenurosis in a goat: Pathological findings and literature review. *Comp Clin Path* 2009; 18(1): 85-87.
20. Willis JM, Herbert I. Some factors affecting the eggs of *Taenia multiceps*: Their transmission onto pasture and their viability. *Ann Trop Med Parasitol* 1984; 78(3): 236-242.
21. Scala A, Varcasia A. Updates on morphobiology, epidemiology and molecular characterization of coenurosis in sheep. *Parassitologia* 2006; 48(1-2): 61-63.
22. Welchman DdB, Bekh-Ochir G. Spinal coenurosis causing posterior paralysis in a goat in Mongolia. *Vet Rec* 2006; 158: 238-239.
23. Hashim M, Rashid M, Nooruddin M. Extraneural coenuriasis in Bengal goats. 4. Treatment. *Bangladesh Veterinarian* 2000; 17(1): 46-49.
24. Abo-Shehada MN, Jebreen E, Arab B, Mukbel R, Torgerson PR. Prevalence of *Taenia multiceps* in sheep in northern Jordan. *Prev Vet Med* 2002; 55(3): 201-207.
25. Tavassoli M, Malekifard F, Soleimanzadeh A, Tajik H, editors. Prevalence of *Coenurus cerebralis* in sheep in Northwest of Iran. *Vet Res Forum* 2011; 2(4): 274-276.
26. Afonso SM, Mukaratirwa S, Hajovska K, et al. Prevalence and morphological characteristics of *Taenia multiceps* cysts (*Coenurus cerebralis*) from abattoir-slaughtered and experimentally infected goats. *J Neuroinfect Dis* 2011; 2.
27. Abdi J, Asadolahi K, Maleki MH, Ashrafi Hafez A. Prevalence of helminthes infection of stray dogs in Ilam province. *J Paramed Sci* 2013; 4(2): 58-61.
28. Adane P, Kumsa B, Hiko A, Afera B. Prevalence of *Coenurus cerebralis* in small ruminants slaughtered at Hashim export abattoir, Debre zeit, Central Oromia. *Eur J Appl Sci* 2015; 7(2): 56-63.
29. Mengistu S, Fayyisa D, Belina D, Eshetu A. Prevalence of *Coenurus cerebralis* and its economic loss in small ruminants slaughtered at Bishoftu Elfora Export Abattoir, Ethiopia. *Eur J Biol Sci* 2017; 9(2): 101-105.

30. Hossain M. Incidence of gid disease in goats [Bangladesh]. Part B: Livestock, Fisheries, Agricultural Engineering and Socio-economics 1991.
31. Miran MB, Nzalawahe J, Kassuku AA, Swai ES. Prevalence of coenurosis in sheep and goats at three slaughter slabs in Ngorongoro District, Tanzania. *Trop Anim Health Prod* 2015; 47(8): 1591-1597.
32. Anwar S, Mahdy E, El-Nesr KA, et al. Monitoring of parasitic cysts in the brains of a flock of sheep in Egypt. *Rev Bras Parasitol Vet* 2013; 22(3): 323-330.
33. Amer S, ElKhatam A, Fukuda Y, et al. Prevalence and identity of *Taenia multiceps* cysts “*Coenurus cerebralis*” in sheep in Egypt. *Acta Trop* 2017; 176: 270-276.
34. Soundararajan C, Sivakumar T, Balachandran C. *Coenurus cerebralis* and its pathology in an organized farm of Tamil Nadu. *J Parasit Dis* 2017; 41(2): 510-513.
35. Karim M. A survey of coenurosis in sheep in northern Iraq. *Trop Anim Health Prod* 2012; 11: 157-158.
36. Oryan A, Moghaddar N, Gaur S. Metacestodes of sheep with special reference to their epidemiological status, pathogenesis and economic implications in Fars Province, Iran. *Vet Parasitol* 1994; 51(3-4): 231-240.
37. Acheneff M, Markos T, Feseha G, Hibret A, Tembely S. *Coenurus cerebralis* infection in Ethiopian highland sheep: incidence and observations on pathogenesis and clinical signs. *Tropical animal health and production* 1999; 31(1): 15-24.
38. Mohammed NH. Prevalence, morphological and biochemical study of larval stage *Coenurus cerebralis* of *Taenia multiceps* in sheep. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 2020; 34(1): 159-163.
39. Uslu U, Guclu F. Prevalence of *Coenurus cerebralis* in sheep in Turkey. *Medycyna Weterynaryjna* 2007; 63(6): 678-680.
40. Pamukçu M, Ertürk E. 1933-1960 yılları arasında Ankara ve yöresinde kopeklerde görülen hastalıklara toplu bir bakış. *Veteriner Fakültesi Dergisi Ankara University* 1961; 8(4): 323-346.
41. Zeybek H. Samsun yöresinde *Coenurus cerebralis*' in yayılışı. *Türk Veteriner Hekimler Dernegi Dergisi* 1977.
42. Biçek K, Karakuş A, Değer M. Prevalence of *Coenurus cerebralis* in Van, Turkey and the significance of the Enolase (NSE) enzyme as a supporting parameter in the diagnosis of Coenurosis. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 2019; 14(2): 185-192.

43. Karakurt E, Nuhoglu H, Sari B, et al. Clinical, histopathological and parasitological evaluation of *Coenurus cerebralis* infecting domesticated and wild ruminants from Kars Province, Turkey. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2019; 12(2): 122-7.
44. Abera S, Wubit T, Nejash A. Cerebral coenurosis in small ruminants: A review. *J Anim Sci Adv* 2016; 6: 1595-1608.
45. Bengier A, Rennie R, Roberts J, Thornley J, Scholten T. A human coenurus infection in Canada. *Am J Trop Med Hyg* 1981; 30(3): 638-644.
46. Ing MB, Schantz PM, Turner JA. Human coenurosis in North America: Case reports and review. *Clin Infect Dis* 1998; 27(3): 519-523.
47. El-On J, Shelef I, Cagnano E, Benifla M. *Taenia multiceps*: A rare human cestode infection in Israel. *Vet Ital* 2008; 44(4): 621-631.
48. Benifla M, Barrelly R, Shelef I, et al. Huge hemispheric intraparenchymal cyst caused by *Taenia multiceps* in a child: Case report. *J Neurosurg Pediatr* 2007; 107(6): 511-514.
49. Templeton A. Human coenurus infection: A report of 14 cases from Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968; 62(2): 251-255.
50. Wilson V, Wayte D, Addae R. Human coenurosis—The first reported case from Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972; 66(4): 611-623.
51. Varcasia A, Tosciri G, Coccone GS, et al. Preliminary field trial of a vaccine against coenurosis caused by *Taenia multiceps*. *Vet Parasitol* 2009; 162(3-4): 285-289.
52. Gicik Y, Kara M, Arslan MO. Prevalence of *Coenurus cerebralis* in sheep in Kars Province, Turkey. *Bull Vet Inst Pulawy* 2007; 51(3): 379.
53. Miran MB. Coenurosis in slab-slaughtered sheep and goats in Ngorongoro district: Prevalence and predisposing factors of the disease. Sokoine University of Agriculture; 2013.
54. Deressa A, Tilahun T, Tadesse A, et al. Assessment of *Coenurus cerebralis* and its economic impact in sheep brain harvested at Ethiopian Health and Nutrition Research Institute, Ethiopia. *Int J Livest Res* 2012; 2(2): 217-226.
55. Aliye J, Deressa FB. Prevalence and economic importance of coenurus cerebralis in sheep and goats in and around “Legahida” district of bale zone, south eastern Ethiopia. *Comp Clin Path* 2017; 26(2): 483-492.
56. Avcioglu H, Kapakin KT, Yildirim A. Clinical, morphological and histopathological features of bovine coenurosis. *Revue Méd Vét* 2012; 163(6): 295-298.
57. Edwards G, Herbert I. Observations on the course of *Taenia multiceps* infections in sheep: clinical signs and post-mortem findings. *Br Vet J* 1982; 138(6): 489-500.
58. Scott P. Diagnosis and treatment of coenurosis in sheep. *Vet Parasitol* 2012; 189(1): 75-78.

59. Natesan V, Mani R, Arumugam R. Clinical aspects of urea cycle dysfunction and altered brain energy metabolism on modulation of glutamate receptors and transporters in acute and chronic hyperammonemia. *Biomed Pharmacother* 2016; 81: 192-202.
60. Macrez R, Stys PK, Vivien D, Lipton SA, Docagne F. Mechanisms of glutamate toxicity in multiple sclerosis: Biomarker and therapeutic opportunities. *Lancet Neurol* 2016 ; 15(10): 1089-1102.
61. Doherty M, Bassett H, Breathnach R, Monaghan M, McErlean B. Outbreak of acute coenuriasis in adult sheep in Ireland. *Vet Rec* 1989; 125(8): 185.
62. Li W, Liu B, Yang Y, et al. The genome of tapeworm *Taenia multiceps* sheds light on understanding parasitic mechanism and control of coenurosis disease. *DNA Res* 2018; 25(5): 499-510.
63. Athar H, Mir AQ, Gugjoo MB, Ahmad RA, Khan HM. Ultrasonography: An affordable diagnostic tool for precisely locating Coenurosis cyst in sheep And goats. *Small Rum Res* 2018; 169: 19-23.
64. Gazioglu A, Simsek S, Kizil O, et al. Clinical, pathological and molecular evaluations and CT scan screening of coenurosis (*Coenurus cerebralis*) in sheep and calves. *Rev Bras Parasitol Vet* 2017; 26(1): 3-9.
65. Wang N, Wang Y, Ye Q, et al. Development of a direct PCR assay to detect *Taenia multiceps* eggs isolated from dog feces. *Vet Parasitol* 2018; 251: 7-11.
66. Varcasia A, Lightowlers MW, Cattoli G, et al. Genetic variation within *Taenia multiceps* in Sardinia, Western Mediterranean (Italy). *Parasitol Res* 2006; 99(5): 622.
67. Varcasia A, Pipia AP, Dessì G, et al. Morphology and genetic variability within *Taenia multiceps* in ruminants from Italy. *Vet Parasitol* 2016; 223: 181-185.
68. Sonmez B, Koroglu E, Simsek S. Molecular characterization and detection of variants of *Taenia multiceps* in sheep in Turkey. *Parasitol* 2017; 144(2): 220-225.
69. Gururaj K, Pawaiya RS, Gangwar NK, et al. Comparative molecular characterization and phylogenetic analysis of cerebral and non-cerebral coenurosis in Indian goats. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 2019; 15: 100266.
70. Wang C, Yu W, Qiu J. The application of dot-immunogold filtration assay for the detection of coenurosis sheep. *Chin J Vet Parasitol* 2001; 9: 12-14.
71. Liu Y, Yang Y, Xu J, et al. Expression and serodiagnostic potential of antigen B and thioredoxin peroxidase from *Taenia multiceps*. *Vet Parasitol* 2019; 272: 58-63.
72. Huang X, Xu J, Wang Y, et al. GP50 as a promising early diagnostic antigen for *Taenia multiceps* infection in goats by indirect ELISA. *Parasit Vectors* 2016; 9(1): 618.

73. Guo C, Wang Y, Huang X, et al. Molecular cloning and bioinformatics analysis of lactate dehydrogenase from *Taenia multiceps*. *Parasitol Res* 2017; 116(10): 2845-2852.
74. Sun Y, Wang Y, Huang X, et al. Characterization of glutathione S-transferase and its immunodiagnostic potential for detecting *Taenia multiceps*. *Vet Parasitol* 2017; 242: 31-37.
75. Kesik HK. *Echinococcus granulosus*'un sığır ve koyun izolatlarındaki antijen B (AgB) gen polimorfizminin belirlenmesi ve serolojik tanı üzerindeki etkinliğinin araştırılması. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2018.
76. Bıyıkoglu G. Deneysel olarak enfekte kuzularda *Coenurus cerebralis*'e praziquantel ve albendazol'un etkisi. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1995.
77. Ghazaei C. Evaluation therapeutic effects of antihelminthic agents albendazole, fenbendazole and praziquantel against coenurosis in sheep. *Small Rum Res* 2007; 71(1-3): 48-51.
78. Aminzhanov M, Musinov M, Baratov V. Chemoprophylaxis of *Coenurus cerebralis* infestation in sheep using febendazole and praziquantel. *Veterinarya* 1988; 10: 46-47.
79. Liccioli S, Bialowas C, Ruckstuhl KE, Massolo A. Feeding ecology informs parasite epidemiology: Prey selection modulates encounter rate with *Echinococcus multilocularis* in urban coyotes. *PLoS One* 2015; 10(3): e0121646.
80. Burgu A, Doganay A, Oge H, Oge S, Sarimehmetoglu O, Gonenc B, Bolukbas CS. Cestod Enfeksiyonlarında Bağışıklık. In: Ozcel MA, Inci A, Turgay N, Koroglu E. (Editorler). *Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji: Türkiye Parazitoloji Derneği*, İzmir 2007: 552-563.
81. Williams JF. Recent advances in the immunology of cestode infections. *J Parasitol* 1979; 65(3): 337-349.
82. Lightowlers M. Fact or hypothesis: Concomitant immunity in taeniid cestode infections. *Parasite Immunol* 2010; 32(8): 582-589.
83. Gauci C, Vural G, Öncel T, et al. Vaccination with recombinant oncosphere antigens reduces the susceptibility of sheep to infection with *Taenia multiceps*. *Int J Parasitol* 2008; 38(8-9): 1041-1050.
84. Verster A, Tustin R. Preliminary report on the stimulation of immunity to the larval stage of *Taenia multiceps*. *J S Afr Vet Assoc* 1982; 53(3): 175-176.
85. Li W, Qu Z, Zhang N, et al. Molecular characterization of enolase gene from *Taenia multiceps*. *Res Vet Sci* 2015; 102: 53-58.
86. Nie HM, Xie Y, Fu Y, et al. Cloning and characterization of the fatty acid-binding protein gene from the protoscolex of *Taenia multiceps*. *Parasitol Res* 2013; 112(5): 1833-1839.

87. Lianos GD, Alexiou GA, Mangano A, et al. The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* 2015; 360(2): 114-118.
88. Joly AL, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun* 2010; 2(3): 238-247.
89. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science* 2002; 295(5561): 1852-1858.
90. Tsan MF, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol* 2009; 85(6): 905-910.
91. Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C. Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion* 2007; 1(1): 53-60.
92. Arya R, Mallik M, Lakhotia SC. Heat shock genes-integrating cell survival and death. *J Biosci* 2007; 32(3): 595-610.
93. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ, Theriault JR. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS letters* 2007; 581(19): 3689-3694.
94. Jegu G, Hazoumé A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* 2013; 332(2): 275-285.
95. Baykal Y, Gök F, Kocabalkan F. Isı şok proteinleri ve hastalıklardaki rolü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2000; 20(3): 187-195.
96. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992; 355(6355): 33.
97. Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med* 2003; 228(2): 111-133.
98. Chiosis G, Vilenchik M, Kim J, Solit D. Hsp90: The vulnerable chaperone. *Drug Discov Today* 2004; 9(20): 881-888.
99. Roy N, Nageshan RK, Ranade S, Tatu U. Heat shock protein 90 from neglected protozoan parasites. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2012; 1823(3): 707-711.
100. Banumathy G, Singh V, Pavithra SR, Tatu U. Heat shock protein 90 function is essential for *Plasmodium falciparum* growth in human erythrocytes. *J Biol Chem* 2003; 278(20): 18336-1845.
101. Chiang AN, Valderramos JC, Balachandran R, et al. Select pyrimidinones inhibit the propagation of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. *Bioorg Med Chem* 2009; 17(4): 1527-1533.
102. Taldone T, Gozman A, Maharaj R, Chiosis G. Targeting Hsp90: Small-molecule inhibitors and their clinical development. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8(4): 370-374.

103. Pallavi R, Roy N, Nageshan RK, et al. Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: Biochemical characterization of Hsp90 from *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma evansi* and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. *J Biol Chem* 2010; 285(49): 37964-37975.
104. Huang J, Chang-fu J. Progress on study of stressproteins of parasites. *Int J Infect Dis* 2006; 33(6): 317-320.
105. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; 22(1): 631-677.
106. Gupta RS, Singh B. Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. *Curr Biol* 1994; 4(12): 1104-1114.
107. Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(19): 6455-6459.
108. Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters* 2007; 581(19): 3702-3710.
109. Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol* 1994; 38(1): 1-17.
110. Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 1998; 80(2): 183-201.
111. Clark MS, Peck LS. HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: a mini-review. *Mar Genomics* 2009; 1(2): 11-18.
112. Otake M, Odashima M, Watanabe S. Role of heat shock proteins (molecular chaperones) in intestinal mucosal protection. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348(1): 1-5.
113. Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RA, Lal AA, Xiao L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-Kilodalton Heat shock protein (HSP70) Gene. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(6): 2385-2391.
114. Yamasaki M, Inokuma H, Sugimoto C, et al. Comparison and phylogenetic analysis of the heat shock protein 70 gene of *Babesia* parasites from dogs. *Vet Parasitol* 2007; 145(3-4): 217-227.
115. Dobbin CA, Smith NC, Johnson AM. Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine *Toxoplasma* infection via immunomodulation of host NF- κ B and nitric oxide. *J Immunol* 2002; 169(2): 958-965.
116. Planelles L, Thomas M, Pulgar M, et al. *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein-70 kDa, alone or fused to the parasite KMP11 antigen, induces functional maturation of murine dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002; 80(3): 241-247.

117. Colebrook AL, . Lightowlers MW. Serological reactivity to heat shock protein 70 in patients with hydatid disease. *Parasite Immunol* 1997; 19(1): 41-46.
118. Wang Y, Nie H, Gu X, et al. An ELISA using recombinant TmHSP70 for the diagnosis of *Taenia multiceps* infections in goats. *Vet Parasitol* 2015; 212(3-4): 469-472.
119. Liu Y, Guo C, Dong X, et al. Molecular characterisation and expression analysis of two heat-shock proteins in *Taenia multiceps*. *Parasite Vector* 2019; 12(1): 93.
120. Tınar R. Türkiye koyun ve keçilerinde helmint hastalıkları. Avrupa Zootekni Fedarasyonu Uluslararası Akdeniz Bölgesi, Koyun ve keçi üretimi Sempozyumu 1983: 17-21.
121. Akkaya H, Vuruşaner C. İstanbul'da kesilen koyunlarda ve danalarda *Coenurus cerebralis*. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1998; 22: 320-324.
122. Ndao M. Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases* 2009; 2009: 278246.
123. De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 1999; 11(1): 1-12.
124. Polla BS. Heat shock proteins in host-parasite interactions. *Immunol Today* 1991; 12(3): 38-41.
125. Liu Y, Guo C, Dong X, et al. Molecular characterisation and expression analysis of two heat-shock proteins in *Taenia multiceps*. *Parasite Vector* 2019; 12(1): 1-10.
126. Stewart GR, Young DB. Heat-shock proteins and the host-pathogen interaction during bacterial infection. *Curr Opin Immunol* 2004; 16(4): 506-510.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şeyma GÜNYAKTI KILINÇ

Doğum Yeri ve Tarihi : Amasya, 17.06.1991

İletişim : seymagunyakti@gmail.com

+90 507 721 8662

Eğitim Bilgileri

Ankara Derbent İlköğretim Okulu : 1997-2001

Ankara Cumhuriyet İlköğretim Okulu : 2001-2003

Ankara Sincan Koç İlköğretim Okulu : 2003-2005

Ankara Cumhuriyet Anadolu Lisesi : 2005-2009

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi : 2009-2014

Fırat Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü : 2015-2020

9. YAYINLAR

1. Gül A, **Günyaktı Kılınç Ş.** Bingöl Belediye Mezbahasında Kesimi Yapılan Kıl Keçilerinde Bit Türlerinin Yaygınlığının Araştırılması. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2016(2):48-53.
2. Gül A, **Günyaktı Kılınç Ş.** Bingöl Belediye Mezbahasında Kesimi Yapılan Koyun ve Keçilerde Dışkı Bakılarına Göre Endoparaziterin Yaygınlığının Araştırılması. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2016(2):61-6.
3. Ahmed H, Simsek S, Saki CE, Kesik HK, **Günyaktı Kılınç S.** Molecular characterization of *Hypoderma* spp. in domestic ruminants from Turkey and Pakistan. Journal of Parasitology. 2017;103(4):303-8.
4. Ahmed H, Sousa SR, Simsek S, Anastácio S, **Günyaktı Kılınç S.** First molecular characterization of *Hypoderma actaeon* in cattle and red deer (*Cervus elaphus*) in Portugal. The Korean Journal of Parasitology. 2017;55(6):653.
5. Kesik HK, **Günyaktı Kılınç Ş.**, Simsek S. Türkiye'nin Farklı İllerinden Elde Edilen Buzağı Dışkılarında *Eimeria* Ookistlerinin Yaygınlığı Ve Ookist Yükünün Belirlenmesi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 2018; 32 (2): 117-120.
6. Khan A, Zahoor S, Ahmed H, Malik U, Butt RA, Muzam MS, **Günyaktı Kılınç S.**, Noor N, Zahoor S, Afzal MS. A retrospective analysis on the cystic echinococcosis cases occurred in Northeastern Punjab Province, Pakistan. The Korean Journal of Parasitology. 2018;56(4):385.

7. Canakoglu SS, Simsek S, Balkaya I, **Gunyakti Kilinc S**. Preliminary evidence for the occurrence of β -tubulin isotype 3 polymorphisms in *Fasciola hepatica* isolates in cattle and sheep in Turkey. *Helminthologia*. 2019;56(2):87-92.
8. Kesik HK, **Gunyakti Kilinc S**, Simsek S, Gul A. Occurrence of Liver Hydatid Cysts in a Donkey and Molecular Characterization of *Echinococcus equinus*. *Journal of Parasitology*. 2019;105(3):442-5.
9. **Gunyakti Kilinc S**, Kesik HK, Simsek S. Molecular characterization and haplotypes of sheep and goat isolates of *Cysticercus tenuicollis* in Turkey. *Parasitology*. 2019;146(8):1047-54.
10. Kesik HK, Simsek S, **Kilinc SG**, Koroglu E. Identification of antigen B (AgB) Gene polymorphism in cattle and sheep isolates of *Echinococcus granulosus* and investigation of effects on serological diagnosis. *Acta Tropica*. 2019;199:105099.
11. Kesik HK, Çelik F, **Günyaktı Kılınç Ş**, Karabulut B, Çevik A, Şimşek S. (2020). Türkiye’de bir yaban domuzu ve katırda hidatik kist olgusu ve moleküler karakterizasyonu. *T. Parazitol Derg.* (Kabul edildi).
12. Irum S, Ahsan A, Ahmed H, Khan A, Yayi G, Mehboob M, **Gunyakti Kilinc S**, Kesik HK, Afzal MS, Ali S, Mehmood M, Celik F, Simsek S. (2020). A demographic survey on the prevalence of gastrointestinal parasites based on socioeconomic determinants in Pakistan. *Journal of Infectious Diseases in Developing Countries* (accepted).

13. Kesik HK, **Gunyakti Kilinc S**, Celik F, Simsek S. Ahmed H (2020). A case-study of the molecular diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in wild boar with comments on its public health significance in Turkey. *Journal of Parasitology* (accepted).
14. Saleem S, Ahmed H, Siddiqui T, **Gunyakti Kilinc S**, Khan A, Afzal MS, Simsek S. Reduce Disease Burden of Human Schistosomiasis in Asia Through Biological Control. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2020;20(12):1118-32.
15. Mehmood S, Simsek S, Celik F, Kesik HK, **Gunyakti Kilinc S**, Haroon A. Molecular survey on cattle and sheep hydatidosis and first detection of *Echinococcus canadensis* (G6/G7) in sheep in Turkey. *Parasitology*. 2020;147(9):1055-62.
16. **Gunyakti Kilinc S**, Celik F, Kesik HK, Simsek S. In Silico Analysis of the Biodiversity and Conservation Status of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit 1 (CO1) Gene of *Taenia multiceps*. *Acta Parasitologica* (accepted), 2020.
17. Khan A, Ahmed H, Khan H, Simsek S, **Gunyakti Kilinc S**, Kesik HK, Yayi G, Celik F, Afzal MS, Budke CM. First report of *Echinococcus canadensis* (G6/G7) by sequence analysis from the Khyber Pakhtunkhwa province of Pakistan. *Acta Tropica*. 2020:105559.