



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE
TÜRKİYE'DEN İZOLE EDİLEN
KUTANÖZ LEİSHMANİOSİS ETKENİ
LEISHMANIA INFANTUM'UN
GENOM DİZİSİNİN ÇIKARILMASI**

Dilek GÜLDEMİR

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe Serpil NALBANTOĞLU**

**ANKARA
2019**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE
TÜRKİYE'DEN İZOLE EDİLEN
KUTANÖZ LEİSHMANİOSİS ETKENİ
LEISHMANIA INFANTUM'UN
GENOM DİZİSİNİN ÇIKARILMASI

Dilek GÜLDEMİR

PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe Serpil NALBANTOĞLU

Bu tez, “Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü” tarafından 28.03.2017 tarih ve 17L0239002 proje numarasıyla desteklenmiştir.

ANKARA
2019

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile Türkiye'den İzole Edilen Kutanöz Leishmaniosis Etkeni *Leishmania infantum*'un Genom Dizisinin Çıkarılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanın ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Dilek GÜLDEMİR

Tarih: 25.01.2019

İmza:



KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Parazitoloji Anabilim Dalında

Dilek GÜLDEMİR tarafından hazırlanan

“Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile Türkiye'den İzole Edilen Kutanöz
Leishmaniosis Etkeni *Leishmania infantum*'un Genom Dizisinin Çıkarılması”

adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak

OY BİRLİĞİ/~~OY ÇOKLUĞU~~ ile kabul/~~ret~~ edilmiştir.

Tez savunma Tarihi: 25.01.2019



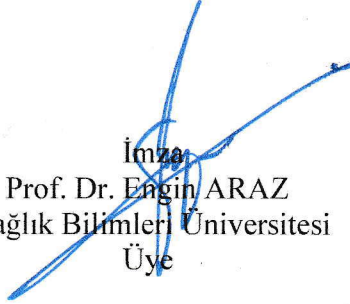
Prof. Dr. Ayşe ÇAKMAK
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Ayşe Serpil NALBANTOĞLU
Ankara Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Mehmet ŞAHAL
Ankara Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Engin ARAZ
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Üye



Dr. Öğretim Üyesi Aycan GAZYAĞCI
Kırıkkale Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xii
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	1
1.2. Sistematik	2
1.3. Morfoloji	3
1.4. Coğrafi Dağılımı ve Ana Rezervuarı	5
1.5. Yaşam Çemberi	5
1.6. Yaptığı Hastalıklar	7
1.7. Epidemiyoloji	9
1.8. Tanı	12
1.8.1. Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırılması	16
1.8.1.1. Mikroskopik Yöntem	16
1.8.1.2. Kültür	16
1.8.1.3. Serolojik Yöntemler	16
1.8.1.4. Moleküler Yöntemler	17
1.8.1.5. Serolojik ve Moleküler Yöntemlerin Tanısal Geçerliliğinin Karşılaştırılması	17
1.8.1.6. Moleküler Tanı Testlerinin Geçerliliği	20

1.9. <i>Leishmania</i> Genomu	22
2. GEREÇ ve YÖNTEM	24
2.1. Örnek Seçimi	24
2.2. DNA İzolasyonu	24
2.3. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	24
2.4. Yeni Nesil DNA Dizileme Uygulamaları	25
2.4.1. Kütüphane Oluşturma	25
2.4.1.1. Genomik DNA (gDNA) Normalizasyonu	26
2.4.1.2. Mekanik Fragmentasyon	26
2.4.1.3. DNA Fragmanlarının Temizlenmesi	26
2.4.1.4. Fragmanların Tek Zincirli 3' ve 5' Uçlarının Küt Uçlara (Blunt-End) Dönüştürülmesi	27
2.4.1.5. 350 bp'den Büyük DNA Fragmanlarının Uzaklaştırılması	27
2.4.1.6. 350 bp'den Küçük DNA Fragmanlarının Uzaklaştırılması	27
2.4.1.7. 3'-Uçların Adenilasyonu	27
2.4.1.8. Adaptör Ligasyonu	28
2.4.1.9. Kütüphane Dizisinin Oluşturulması	29
2.4.1.10. Kütüphane Kalite Kontrolü ve Normalizasyonu	29
2.4.2. Sekans Reaksiyonu ve Yürütme	32
2.4.2.1. DNA Kütüphanelerinin Akış Hücresi (Flow Cell) Yüzeyine Bağlanması ve Kümelerin Oluşturulması	32
2.4.2.2. HiSeq 2500'ün Dizilemeye Hazırlanması	32
2.4.2.3. İlk Adımda Oluşturulan Akış Hücresi Üzerindeki Kümelerin Dizilenmesi	33
2.4.3. Biyoinformatik Analizler	33

3. BULGULAR	39
4. TARTIŞMA	67
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	101
ÖZET	105
SUMMARY	107
KAYNAKLAR	109
ÖZGEÇMİŞ	118



ÖNSÖZ

Günümüzde *Leishmania* türleri üzerinde yapılan tüm genom dizileme çalışmaları oldukça sınırlı olup, sadece birkaç *Leishmania* türünün yüksek kalite ve tamamlanmış genomu bulunmaktadır. Bu tez, “Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi” ile Türkiye’de kütanöz leishmaniosis olgusundan izole edilen *Leishmania infantum*’un tüm genom dizisinin çıkarılmasını kapsamaktadır. Çalışmanın kütanöz leishmaniosis etkeni *L. infantum* ile yapılmış olması çalışmayı daha özgün hale getirmektedir. Elde edilen verilerin ülkemizde yapılacak *Leishmania* genom çalışmaları için bir temel oluşturduğu ve küresel düzeydeki tüm genom dizileme çalışmalarına katkı sağladığı kanaatindeyiz.

Doktora eğitimim boyunca desteklerinden ve tez çalışmalarımıdaki önemli katkılarından dolayı beni hep destekleyen, bilimsel ve manevi olarak arkamda duran, bugün bu noktaya gelmemde çok büyük katkısı olan danışmanım Prof. Dr. Ayşe Serpil NALBANTOĞLU’na, desteğini her zaman yüreğimde hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Zafer KARAER’e, tez izleme komitesi üyesi olan ve her zaman beni destekleyen değerli hocam Prof. Dr. Ayşe ÇAKMAK ve Prof. Dr. Mehmet ŞAHAL’a saygı ve şükranlarımı sunuyorum. Tez çalışmamı destekleyen Ankara Üniversitesi BAP koordinasyon birimine teşekkür ederim.

En önemlisi, tüm bu zorlu eğitim sürecim boyunca kendilerine yeterince zaman ayıramadığım halde hoşgörü ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, sevgi ve güvenleriyle her zaman arkamda olan sevgili annem Halise GÜLDEMİR ve babam Tahsin GÜLDEMİR’e sonsuz teşekkür ediyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATL	Adenin Ekleme Karışımı
n	Aynı Protein Üzerinde Meydana Gelen Toplam Polimorfizm Sayısı
bp	Baz Çifti
BAP	Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
CDC	Centers For Disease Control And Prevention (Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DOR	<i>Diagnostic Odds Ratio</i>
DAT	Direkt Aglütinasyon Testi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
AIDS	Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EtOH	Etil Alkol (C ₂ H ₅ OH)
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
CI	Güven Aralığı
AMS	Hızlı Amplifikasyon Mixi
FDR	Hızlı Denatürasyon Mixi

FLM1	Hızlı Lineerizasyon Mixi 1
FLM2	Hızlı Lineerizasyon Mixi 2
FPM	Hızlı Ön Mix
FRM	Hızlı Tekrar Sentez Mixi
HT	Hibridizasyon Tamponu
IFAT	İmmüno Floresan Antikor Testi
HP12	İndeks Okuma Primeri 1
HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
QT-NASBA	Kantitatif Nükleik Asit Dizi Tespitine Dayalı Amplifikasyon
Chr	Kromozom
CL	Kutanöz Leishmaniosis
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
SPB	Manyetik Pürifikasyon Boncukları
mRNA	Messenger RNA
MRLBÜDB	Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı
μ l	Mikrolitre
MCL	Mukokutanöz Leishmaniosis
ng	Nano Gram

NCBI	<i>National Center For Biotechnology Information</i>
NASBA	<i>Nucleic Acid Sequence-Based Amplification</i>
HP10	Okuma Primeri 1
HP11	Okuma Primeri 2
PE	<i>Paired-End</i>
PCR-RFLP	PCR ve Restriksiyon Enzim Analizi
EPM	PCR Zenginleştirme Miksi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PKDL	Post Kala Azar Dermal Leishmaniosis
PPC	Primer Kokteyl Miksi
ncRNA	Protein Kodlamayan RNA
CDS	Protein Kodlayan Bölge
QUADAS	<i>Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies</i>
rRNA	Ribosomal
°C	Santigrad
sROC	<i>Symmetric Summary Receiver Operating Characteristic</i>
SNP	Tek Nükleotit Polimorfizmi
RSB	Tekrar Süspansiyon Tamponu

TdT	Terminal Deoksintükleotid Transferaz
tRNA	Transfer RNA
WGS	Tüm Genomu Dizisi
THSK	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
spp	Türleri
ERP	Uç Tamir Edici Karışım
VL	Visseral Leishmaniois, Kala Azar
NGS	Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojisi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	<i>Leishmania</i> türlerinin güncel sınıflandırması	3
Şekil 1.2.	Visseral leishmaniosis kemik iliği preparatı (ışık mikroskobu)	4
Şekil 1.3.	(Sol) Kemik iliğinden yapılan preparata <i>L. amazonensis</i> 'in faz kontrast mikroskopik görüntüsü, yıldız ile işaretlenmiş vakuol içerisinde amastigotlarla enfekte makrofaj. Bar= 10 µm. (Sağ) Saha-emisyon taramalı elektron mikroskobisi, makrofaj içerisinde amastigotlar (kırmızı) görülmektedir. Bar= 5µm	4
Şekil 1.4.	<i>Leishmania</i> 'nın gelişim safhaları	6
Şekil 1.5.	(Sol) Kutanöz leishmaniosis, Guetamalalı bir hastada ülseratif deri lezyonu. (Sağ) Visseral leishmaniosis, Nepal'den bir hastada belirgin splenomegali	8
Şekil 1.6.	Köpek leishmaniosis. (Sol) Visserokutanöz tutulum, (Sağ) Onchogryphosis	8
Şekil 1.7.	Visseral Leishmaniosisin Global Dağılımı, 2016	10
Şekil 1.8.	Kutanöz Leishmaniosisin Global Dağılımı, 2016	10
Şekil.1.9.	Global CL Sürveyansı-Avrupa Bölgesi, 2006-2015	11
Şekil.1.10.	Global VL Sürveyansı-Avrupa Bölgesi, 2006-2015	11
Şekil 1.11.	Kala-azarın tanısı için alınabilecek örnekler ve tanı yöntemleri için akış şeması	14
Şekil 1.12.	Şark çıbanının tanısında alınabilecek örnekler ve tanı yöntemleri için akış şeması	15

Şekil 1.13.	Çalışmaların seçim süreci	18
Şekil 1.14.	Test performanslarının özeti	19
Şekil 1.15.	İncelenen çalışmaların iş akış şeması	21
Şekil 2.1.	Kütüphane Oluşturulması	30
Şekil 2.2.	QC Raporu	33
Şekil 2.3.	BB tools aracı ile hatalı sekansların filtrelenmesi ve coverage değerlerinin normalizasyonu	34
Şekil 2.4.	Referans genoma ait 36 kromozomun tek dosya halinde listelenmesi	34
Şekil 2.5.	Haritalama ve anotasyon	35
Şekil 2.6.	Varyasyonların saptanması	36
Şekil 2.7.	Varyasyon analizi örneği. 12. Kromozom (NC_009396)- Yüzey antijeni geni (Putative surfage antigen protein kinase, CDS) üzerinde frame-shift mutasyon bölgesinin saptanması	36
Şekil 2.8.	Varyasyon analizi örneği. 1. Kromozom (NC_009386)- Metallopeptidaz geni (metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3 CDS) üzerinde frame-shift mutasyon bölgesinin saptanması	37
Şekil 2.9.	Varyasyon analizi örneği. 1. Kromozom (NC_009386)- Metallopeptidaz geni (metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3 CDS) üzerinde frame-shift mutasyon bölgesinin incelenmesi	37
Şekil 3.1.	<i>Leishmania infantum</i> _TR01 (Lin_TR01)	39

Şekil 3.2.	NCBI’da yer alan <i>L. infantum</i> WGS dizileri	40
Şekil 3.3.	Lin_TR01 suşunun 36. kromozomu üzerindeki anotasyon örneği	40
Şekil 4.1.	<i>Leishmania</i> türlerinde korunmuş psödogenler	67
Şekil 4.2.	<i>Leishmania</i> türlerinde psödogenler	68
Şekil 4.3.	Venn diagramı	68
Şekil 4.4.	<i>Leishmania donovani</i> izolatlarında fonksiyonel varyasyonların filogenetik analizi	70
Şekil 4.5.	Bu çalışmada kullanılan biyoinformatik analizin iş akış şeması	71

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Zoonotik Leishmaniosis Etkenleri, Coğrafi Dağılımı ve Başlıca Rezervuarları	5
Çizelge 2.1.	Kütüphane Dizisi Oluşturmada Kullanılan Primerler ve Dizileri	28
Çizelge 3.1.	Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi	42
Çizelge 4.1.	Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme	75

1. GİRİŞ

1.1. Tarihçe

Leishmaniosis'in birinci yüzyıla kadar uzanan bir geçmişi olduğu bilinmektedir. Ekvator ve Peru bölgesinden çıkarılan İnka dönemine ait kalıntılarda kutanöz ve mukokutanöz Leishmaniosis'in tipik cilt lezyonları ve yüz deformiteleri tasvir edilmiştir. On beşinci ve 16. yüzyıldan itibaren, And dağlarında yaşayan tarım işçilerinde tipik cilt lezyonlarının varlığı çok sayıda İspanyol kâşif tarafından kaydedilmiştir. Cüzzam lezyonlarını andıran bu ülserler beyaz cüzzam (white leprosy), And hastalığı (Andean sickness) veya vadi hastalığı (valley sickness) olarak tanımlanmıştır (Mukherjee, 2018).

On sekizinci yüzyılın ortalarında Afrika ve Hindistan'da visseral leishmaniosis "Kala-azar" ya da "black fever" olarak bildirilirken, yine aynı yüzyılda Alexander Russell kutanöz leishmaniosis hastalığını klinik olarak tanımlanmıştır (Mukherjee, 2018; Russell, 1756). Russell (1756) bir Türk hastayı muayene ettikten sonra, ülserlerin irrite edilmeği sürece nadiren ağrılı ve aylar içinde mor bir renk alarak iyileşen ve skatrise olduktan sonra hayat boyu kalan çirkin bir iz bırakan özellikleri olduğunu ortaya koymuştur. Russell bu hastalığı, halep çıbanı (*Aleppo boil*) olarak isimlendirmiştir.

Yirminci yüzyılın başlarında, Hindistan'daki İngiliz Ordusunda bir doktor olan William Leishman'ın çalışmalarından sonra hastalık "leishmaniosis" olarak tanınmıştır. Leishman, 1901 yılında Kalküta yakınlarındaki bir kasaba olan Dum Dum'da, ateş nöbetleri, anemi, kas ve splenomegalisi olan bir İngiliz askerinin dalağında "ovoid bodies"leri keşfetmiştir. Leishman (1903), hastalığı "dum dum ateşi" olarak tanımlamış ve bulgularını 1903 yılında yayınlamıştır. Aynı dönemde Donovan (1903), Kala-azar hastalarında benzer bulguları saptamış ve Leishman'ın keşfinden birkaç hafta sonra yayınlamıştır. Leishman boyası ile boyanan bu amastigotlara, Leishman-Donovan cisimcikleri adı verilirken etken *Leishmania donovani* olarak

adlandırılmıştır (Donovan, 1903). Bu keşfin ardından bu konu ile ilgili pek çok çalışma yapılmış ve yirminci yüzyılının sonlarında, Gibson (1983) tarafından hastalığın ve parazitin tanımlanması ile ilgili çalışmalar detaylı bir şekilde özetlenmiştir.

1.2. Sistematik

Kinetoplasta kök altında yer alan *Leishmania* soyunda en az 21'i memelilerde hastalık yapabilen 30 kadar tür bulunmakta olup, *L. infantum*'un klasik sınıflandırması aşağıdaki gibidir (Eckert ve ark., 2008).

Alem: Protista (Eukaryota)

Kök: Euglenozoa

Kök-Altı: Kinetoplasta

Sınıf: Trypanosomatidea

Dizi: Trypanosomatida

Alt-Dizi: Trypanosomatina

Aile: Trypanosomatidae

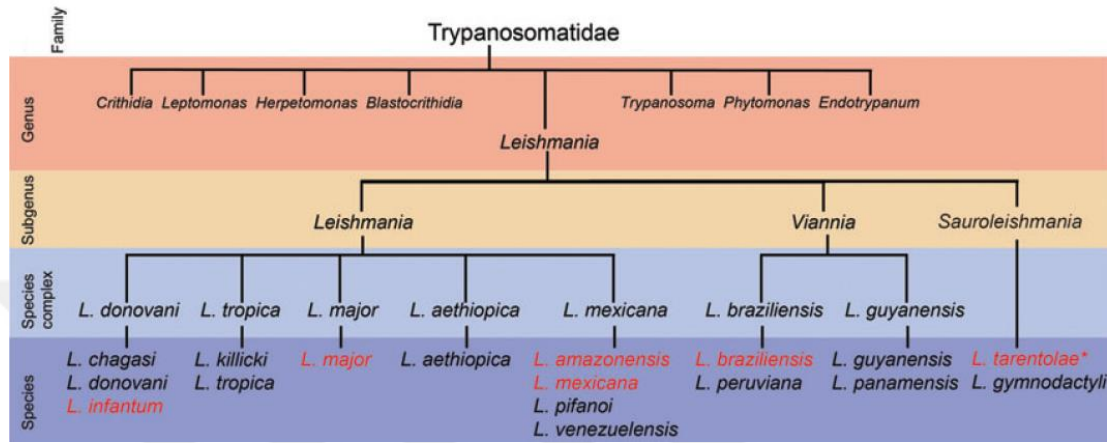
Soy: *Leishmania*

Tür: *Leishmania infantum*

Son yıllarda yeni nesil DNA dizileme teknolojisi (Next generation sequencing, NGS) gelişmesiyle *Leishmania* genomu üzerinde yapılan **Atasal DNA*** çalışmaları, tarihsel olarak yaklaşık olarak 20-100 milyon yıl önce ***Leishmania* genusunun *Viannia* ve *Leishmania* subgenuslarına** ayrıldığını göstermiştir (Peacock ve ark., 2007). *Leishmania* türlerinin hibritler oluşturabileceği hakkında elde edilen bulgular ve bu konuda moleküler yöntemlerle yapılan analizlerde genetik çeşitliliğin ileri düzeyde olduğu görülmüş, **tanımlanmış türlerin geçerli olmadığı ve bu nedenle taksonominin yeniden yapılanması** gerektiği belirtilmiştir (Akopyants ve ark., 2009;

***Atasal DNA:** Yeni nesil dizileme sistemleri ile fosilden, saç, kemik gibi donmuş veya korunmuş örneklerden elde edilen DNA'lann geniş kapsamlı analizini yapmak mümkündür. Dizileme sonucunda, atasal hedef diziler çevresel kontaminasyondan ayırt edilebilir.

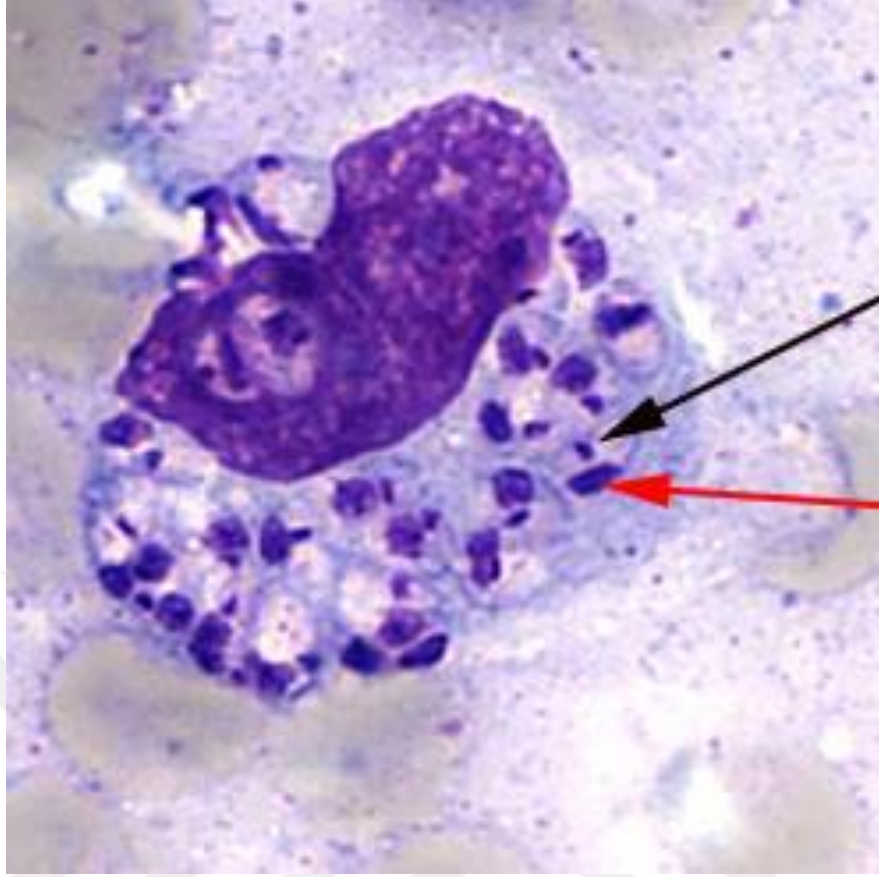
Heitman, 2006; Lukes ve ark., 2007; Miles ve ark., 2009). İzoenzim analizleri, moleküler metodlar veya monoklonal antikolar kullanılarak yapılan *Leishmania* türlerinin güncel sınıflandırmaları Şekil 1.1’de gösterilmiştir (Bates, 2007; Heymann ve David, 2008; WHO, 2010).



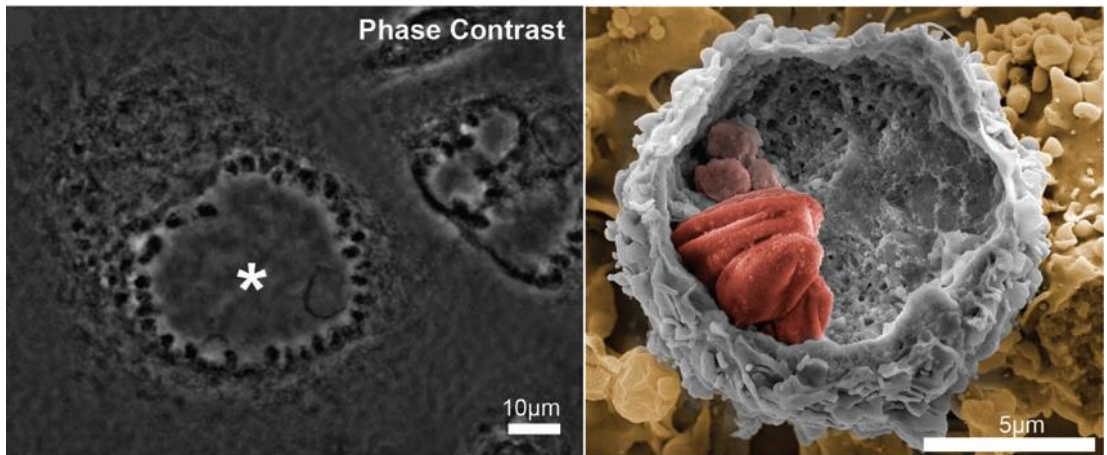
Şekil 1.1. *Leishmania* türlerinin güncel sınıflandırması (İzoenzim analizleri, moleküler metodlar veya monoklonal antikolar kullanılarak ayrımları) (Bates, 2007; WHO, 2010).

1.3. Morfoloji

Leishmania türleri intrasellüler protozoonlardır. *Leishmania* türleri insan, köpek, kedi ve kemiricilerce leishmaniosis adı verilen zoonotik bir hastalığın etkenidir. *Leishmania* vektörü *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* soyundan olup; halk arasında yakarca olarak da bilinmektedir. *Leishmania* cinsine ait türlerin yaşam devrelerinde memeli konakta görülen "**amastigot**" ve vektörde görülen "**promastigot**" olmak üzere iki form bulunmaktadır. Parazitin her iki formunda da gruba özgü olan ve "**kinetoplast**" denilen nukleustan daha koyu boyanmış bir yapı bulunmaktadır (Şekil 1.2 ve 1.3) (CDC, 2018a; Karaer ve Nalbantoğlu, 2015).



Şekil 1.2. Visseral leishmaniosis kemik iliği preparatı (ışık mikroskobu). *Leishmania amastigotları* ile enfekte makrofaj görülmektedir. Şekilde amastigot çekirdeği kırmızı ok ile, **kinetoplast** ise siyah ok ile gösterilmektedir. Kinetoplastın görülmesi tanısal açıdan çok önemlidir (CDC, 2018a).



Şekil 1.3. (Sol) Kemik iliğinden yapılan preparata *L. amazonensis*'in faz kontrast mikroskobik görüntüsü, yıldız ile işaretlenmiş vakuol içerisinde amastigotlarla enfekte makrofaj. Bar= 10 µm. **(Sağ)** Saha-emisyon taramalı elektron mikroskobisi, makrofaj içerisinde amastigotlar (kırmızı) görülmektedir. Bar= 5µm (Real ve ark., 2013).

1.4. Coğrafi Dağılımı ve Ana Rezervuarı

Leishmania türleri Eski Dünya (Avrupa, Afrika ve Asya) ve Yeni Dünya (Amerika) olmak üzere iki ana grup içerisinde incelenirler. En az 21'i memelilerde patojen olan 30 türü tanımlanmıştır. Zoonotik *Leishmania* türleri ve coğrafi dağılımları ile rezervuarları Çizelge 1.1'de özetlenmiştir (Dawit ve ark., 2013).

Çizelge 1.1. Zoonotik Leishmaniosis Etkenleri, Coğrafi Dağılımı ve Başlıca Rezervuarları.

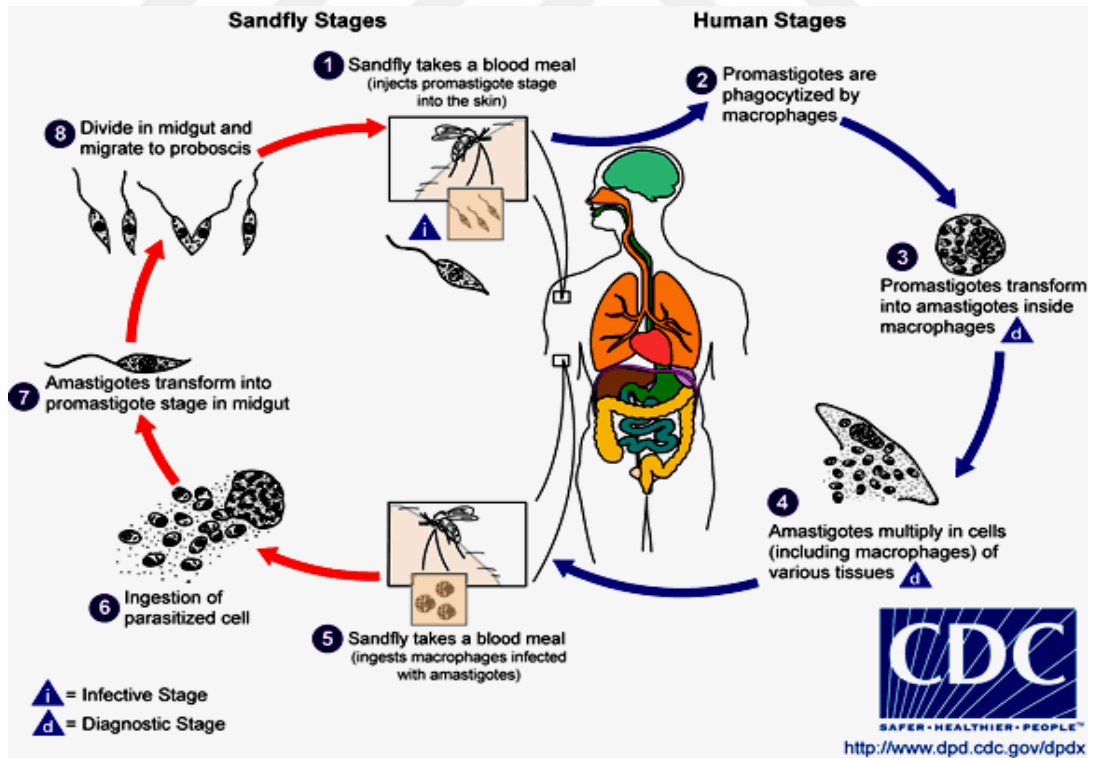
<i>Leishmania</i> Türü	İnsandaki Hastalık	Coğrafi Dağılımı	Ana Rezervuarı
<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	VL; LCL	Akdeniz havzası; Orta Doğu ve Orta Asya'dan Pakistan'a kadar olan bölge; Çin, Orta ve Güney Amerika	Köpek
<i>Leishmania (L) major</i>	LCL	Kuzey Afrika, Ortadoğu ve Orta Asya, Sahra altı Afrika ve Sahil Kuşağı (Senegal, Moritanya, Mali, Burkina Faso, Nijer, Nijerya, Çad, Sudan ve Eritre)	Gerbillidae (Çöl fareleri)
<i>Leishmania (L) aethiopica</i>	LCL; DCL	Etiyopya, Kenya	Rock hyraxes (Kaya damanı)
<i>Leishmania (L) mexicana</i>	LCL	Orta Amerika	Çeşitli orman kemirgenleri
<i>Leishmania (L) amazonensis</i>	LCL	Güney Amerika, Amazonların kuzeyi	Orman kemirgenleri
<i>Leishmania (L) venezuelensis</i>	LCL	Venezuela	Bilinmiyor
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	LCL; MCL	Güney Amerika, Orta Amerika ve Meksika	Pekçok yağmur ormanı memelisi
<i>Leishmania (V) peruviana</i>	LCL	Peru And Dağları	Köpek

Visceral leishmaniosis (VL), Lokalize kutanöz leishmaniosis (LCL), Diffüz kutanöz leishmaniosis (DCL), Mukokutanöz leishmaniosis (MCL) (Gramiccia ve Gradoni, 2005).

1.5. Yaşam Çemberi

Leishmania türlerinin hayat siklusu Phlebotominae vektörle, vertebralı konak arasında birbirini takip eden düzenli bir döngü içerir. Heteroksen gelişim gösteren etkenin vektörlüğünü, *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* soyundaki yakarcalar yapmaktadır.

Parazitler, enfekte vektör yakarcalar tarafından kan emme sırasında konakçıya verilir, konakçının makrofaj ve makrofaj benzeri hücrelerine invaginasyonla girerek, parazitofor vakuol içinde gelişmeye başlarlar. Etken, yakarcaların sindirim kanalının farklı kısımlarında birkaç morfolojik form göstermektedir. Bu durum, sindirim kanalının değişik kısımlarındaki farklı koşullara parazitin uyum sağlamasına bağlanmaktadır. Bu şekilde enfekte olan konaktan, vektör kan emme esnasında makrofajlarla birlikte amastigotları da alır. Makrofajların yakarcanın midesinde parçalanması ile serbest kalan **amastigotlar** boylarının uzaması ve kamçı gelişimi ile **promastigotlara** dönüşür. Promastigotlar bölünerek çoğalırlar ve ön mideye oradan da özefagusu geçerler. Özefagustaki promastigotlar enfektif yapıya sahiptirler ve uzun kamçıların bulunması, arka uçlarının sivri ve dar olması ile diğer promastigot formlardan ayrılırlar. Promastigotların tatarcıkların ağız organeline gelmesiyle döngü tamamlanır (Şekil 1.4) (CDC, 2018b).



Şekil 1.4. *Leishmania*'nın gelişim safhaları (CDC, 2018b).

1.6. Yaptığı Hastalıklar

Leishmania türleri insanlarda genel olarak üç farklı klinik tablo (visseral, kutanöz ve mukokutanöz leishmaniosis) ortaya çıkarmaktadır. Daha sonraları, diffüz (yaygın) kutanöz leishmaniosis (DCL, DKL) ve Post Kala Azar dermal leishmaniosis (PKDL) de bu klinik tablolara eklenmiştir. Ayrıca *Leishmania* türleri, doğada bu parazitlerinin rezervuarı olan köpekgillerde "Canine Leishmaniosis" kedilerde ise "Feline Leishmaniosis" etkenidir (CDC, 2018c; Özcel, 2007).

Visseral leishmaniosis (VL; iç organlar leishmaniosis), Kala-Azar olarak da adlandırılan kronik sistemik bir hastalıktır. Hastalık, *Leishmania* spp. amastigotlarının retikuloendotelial sistem hücrelerinde yerleşmesi ile gelişir. Ateş (düzensiz olabilir), splenohepatomegali, zayıflama, halsizlik, pansitopeni (veya anemi, lökopeni, trombositopeni), hipergamaglobülinemi görülen semptomlar arasındadır (Şekil 1.5). Türkiye’de etken *Leishmania infantum* türüdür. Tedavi edilmediğinde ölümlerle sonuçlanabilen ve bazı özellikleri ile sıtma, lösemi, lenfoma gibi hastalıklarla karışabilen VL’nin kesin tanısı laboratuvara dayanır. Kala-Azar ülkemizde bildirim zorunlu bir hastalıktır (Resmi Gazete, 2011; Sağlık Bakanlığı, 2004). Aktif vaka saptama ve tedavi hastalığın kontrolünde anahtar unsurlar olarak kabul edilmektedir (WHO, 2010).

Kutanöz leishmaniosis (CL) şark çıbanı olarak da adlandırılmaktadır ve genellikle vücudun giysi ile örtülmeyen açıkta kısımlarındaki deri bölgesinde bir veya birden fazla lezyonla karakterli bir hastalıktır. Lezyonlar ağrısız eritemli papül/nodül veya ülser lezyonlar şeklindedir (Şekil 1.5). Tedavi edilmediğinde yaklaşık bir yıl içerisinde düzensiz bir skar bırakarak iyileşir. Hastalığın endemik olduğu bölgelerde bu tür lezyonların görülmesi hastalığı akla getirirse de kesin tanısı laboratuvara dayanır. Şark çıbanı bildirim zorunlu bir hastalıktır (Resmi Gazete, 2011; Sağlık Bakanlığı, 2004). Ülkemizde bazı bölgeler şark çıbanı için endemik olup, Sağlık Bakanlığı hastalığın eliminasyonu için bir program yürütmektedir (Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, 2003).



Şekil 1.5. (Sol) Kutanöz leishmaniosis, Guetamalalı bir hastada ülseratif deri lezyonu (Credit: B. Arana, MERTU, Guatemala). (Sağ) Visseral leishmaniosis, Nepal'den bir hastada belirgin splenomegali (CDC, 2018c).

Leishmaniosisli köpeklerde parazitler visserokutanöz yerleşimlidir. Klinik bulgular, insan VL bulguları ile benzemekte olup ek olarak tüylerin dökülmesi, onychogryphosis ve ileri derecede zayıflama gibi semptomlar da görülmektedir (Şekil 1.6) (Ribeiro, 2018). Kedilerin leishmaniosis için uygun konak olmadığı bildirilmekle birlikte, sporadik vakalar da hem sistemik hem de cilt tutulumunun olduğu birkaç çalışma ile gösterilmiştir (Özcel, 2007).



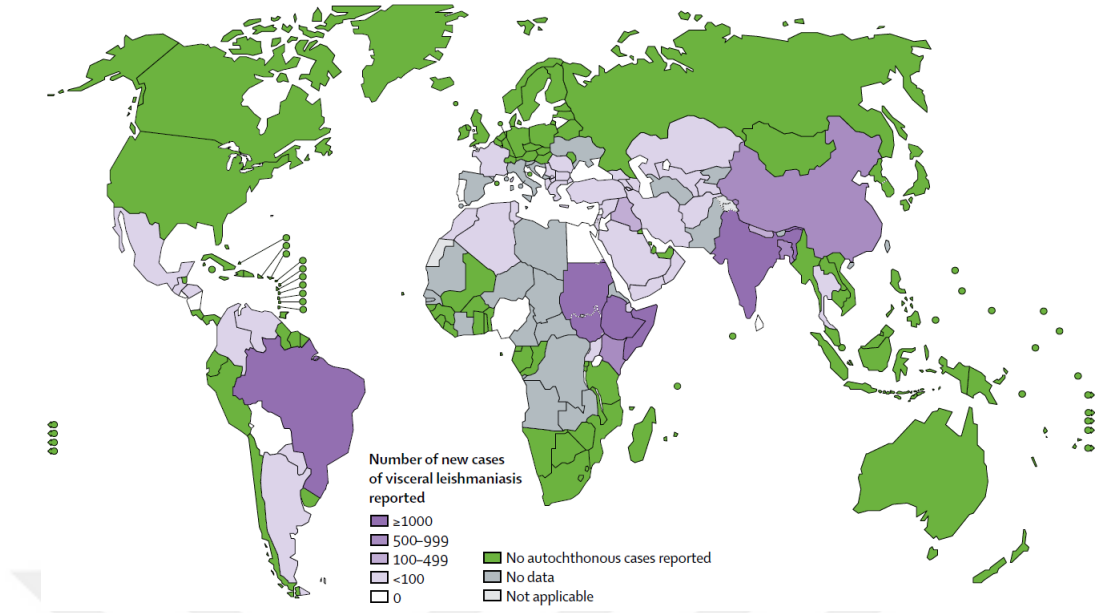
Şekil 1.6. Köpek leishmaniosis. (Sol) Visserokutanöz tutulum. (Sağ) Onychogryphosis (Ribeiro, 2018).

1.7. Epidemiyoloji

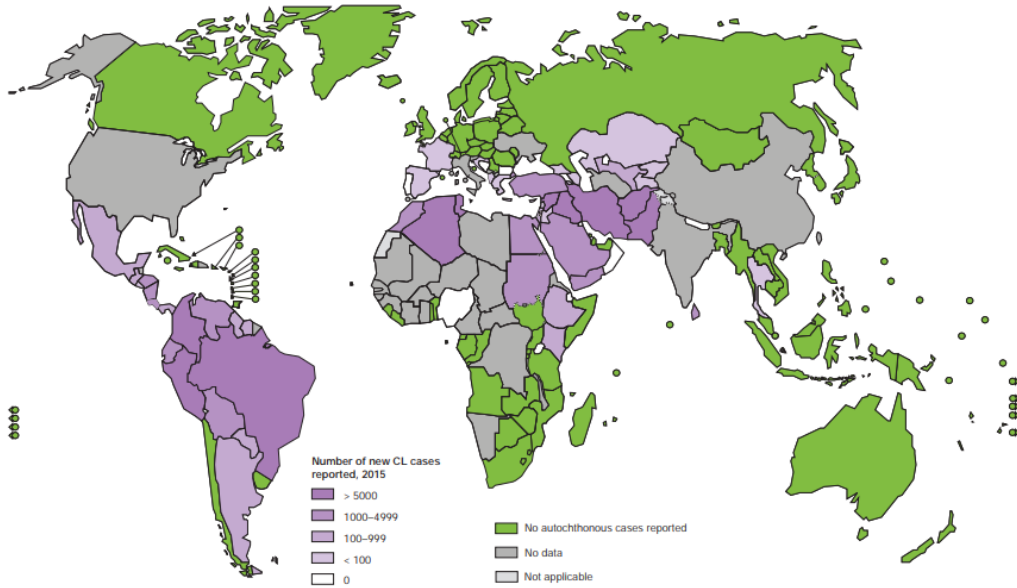
Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre leishmaniosis hala dünyanın en çok ihmal edilen hastalıklardan biridir. Gelişmekte olan yoksul ülkeler başta olmak üzere dünya genelinde her yıl yaklaşık 2 milyon kişinin leishmaniosise yakalandığı ve 350 milyondan fazla insanın risk altında olduğu belirtilmektedir (WHO, 2010).

Visseral leishmaniosis 60'dan fazla ülkede endemik olmakla beraber visseral leishmaniosis vakalarının %90'ından fazlası yedi ülkeden (Brezilya, Etiyopya, Hindistan, Kenya, Somali, Güney Sudan ve Sudan) bildirilmektedir (Şekil 1.7) (WHO, 2018a). Kutanöz leishmaniosis vakalarının çoğu (%90) Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, İran, Pakistan, Peru, Suudi Arabistan ve Suriye'de görülmektedir (Şekil 1.8) (WHO, 2018a). Mukokutanöz leishmaniosis vakalarının ise yaklaşık %90'ı Bolivya, Brezilya ve Peru'dan rapor edilmiştir (WHO, 2015).

Visseral leishmaniosis Doğu Afrika (Etiyopya, Kenya, Güney Sudan ve Sudan) ve Güney-Doğu Asya ve Hindistan yarımadasında tekrarlayan epidemilere neden olmuş ve etkilenen topluluklarda yüksek morbidite ve mortaliteye yol açmıştır (İbrahim, 2002; Kohn, 2007; WHO, 2015). Bununla beraber son on yılda dünya çapında visseral leishmaniosis insidansı önemli ölçüde azalmış olup, 2012'de yıllık yeni vaka sayısı 200 000 ila 400 000 arasında iken; 2017'de 50 000 ve 90 000'e gerilemiştir (Burza ve ark., 2018).



Şekil 1.7. Visseral Leishmaniosisin Global Dağılımı, 2016 (WHO, 2018a).



Şekil 1.8. Kutanöz Leishmaniosisin Global Dağılımı, 2016 (WHO, 2018a).

Türkiye’de şark çibannının en çok görüldüğü iller Şanlıurfa, Osmaniye, Adana, Hatay, Aydın olup, Afyon, Muğla, Kahramanmaraş ve Mersin illerimizde de endemiktir. Ülkemizde en sık görülen etken *L. tropica* antroponotik (insan-vektör-insan geçişli) özelliktedir. Ülkemizde 2006-2015 yıllarına ait CL vakaları şekil 1.9’de görüldüğü gibidir.

Country – Pays	Status of endemicity – Degré d’endémicité	Cutaneous leishmaniasis (CL) – Leishmaniose cutanée (LC)															
		Number of cases of CL reported – Nombre de cas de LC signalés										Number of imported CL cases reported – Nombre de cas de LC importés signalés					
		2015	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2013	2014	2015		
Serbia – Serbie	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR
Slovakia – Slovaquie	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR
Slovenia – Slovénie	Endemic – Endémique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NICR	NICR	NICR	NICR	NICR
Spain – Espagne	Endemic – Endémique	6	6	16	10	10	10	18	ND	100	40	NICR	NICR	NICR	NICR	NICR	NICR
Sweden – Suède	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR
Switzerland – Suisse	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR
Tajikistan – Tadjikistan	Endemic – Endémique	ND	13	38	22	3	13	26	86	128	83	0	ND	ND	ND	ND	ND
The former Yugoslav Republic of Macedonia – Ex-République yougoslave de Macédoine	Endemic – Endémique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Turkey – Turquie	Endemic (high burden) – Endémique (charge de morbidité élevée)	1892	1499	1161	1696	2237	1803	1898	2268	1678	1986	3094	2672	815			
Turkmenistan – Turkménistan	Endemic – Endémique	69	101	89	ND	ND	81	158	59	55	49	0	0	0			
Ukraine	Previously reported cases – Préablement notifié	2	1	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NICR	NICR	NICR			
United Kingdom – Royaume-Uni	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR
Uzbekistan – Ouzbékistan	Endemic – Endémique	103	55	153	366	610	239	201	505	ND	508	0	ND	ND			
Subtotal – Sous-total		2717	2658	2421	2296	3158	2219	2354	3303	2341	2947	3220	2764	953			

Şekil.1.9. Global CL Sürveyansı-Avrupa Bölgesi, 2006-2015 (WHO, 2018b).

Country – Pays	Status of endemicity – Degré d’endémicité	Visceral leishmaniasis (VL) – Leishmaniose viscérale (LV)															
		Number of VL cases reported – Nombre de cas de LV signalés										Number of imported VL cases reported – Nombre de cas de LV importés signalés					
		2015	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2013	2014	2015		
Serbia – Serbie	Previously reported cases – Préablement notifié	ND	ND	ND	ND	ND	2	1	2	ND	0	0	ND	ND			
Slovakia – Slovaquie	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR
Slovenia – Slovénie	Endemic – Endémique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Spain – Espagne	Endemic (high burden) – Endémique (charge de morbidité élevée)	246	255	193	179	153	235	213	276	106	4	ND	ND	ND			
Sweden – Suède	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR
Switzerland – Suisse	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR
Tajikistan – Tadjikistan	Endemic – Endémique	19	14	15	53	40	25	46	63	47	26	ND	ND	ND			
The former Yugoslav Republic of Macedonia – Ex-République yougoslave de Macédoine	Endemic – Endémique	9	7	7	4	12	2	13	20	11	4	0	0	0			
Turkey – Turquie	Endemic – Endémique	20	41	13	23	36	30	13	33	22	23	ND	ND	ND			
Turkmenistan – Turkménistan	Endemic – Endémique	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0	ND	ND	0	0	0			
Ukraine	Endemic – Endémique	3	3	2	ND	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
United Kingdom – Royaume-Uni	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR	NACR
Uzbekistan – Ouzbékistan	Endemic – Endémique	8	5	10	26	23	24	40	35	ND	34	0	ND	ND			
Subtotal – Sous-total		771	890	682	606	599	612	610	745	367	287	23	14	21			

Şekil.1.10. Global VL Sürveyansı-Avrupa Bölgesi, 2006-2015 (WHO, 2018b).

Kala azar (VL) dünyada tropikal ve subtropikal bölgelerin kırsal kesimleri başta olmak üzere pek çok ülkede endemiktir. Türkiye’de de görülen bu hastalık özellikle Akdeniz ve Ege bölgelerinden olmak üzere hemen her bölgeden sporadik

olarak bildirilebilmektedir. Kala-Azar esasen bir zoonozdur ve etkenin başlıca rezervuarları evcil ve yabani kanidlerdir (köpek, tilki, çakal). Etken doğada konaklar arasında vektörler aracılığı ile yayılır. Ülkemizde 2006-2015 yıllarına ait VL vakaları Şekil 1.10'de görüldüğü gibidir.

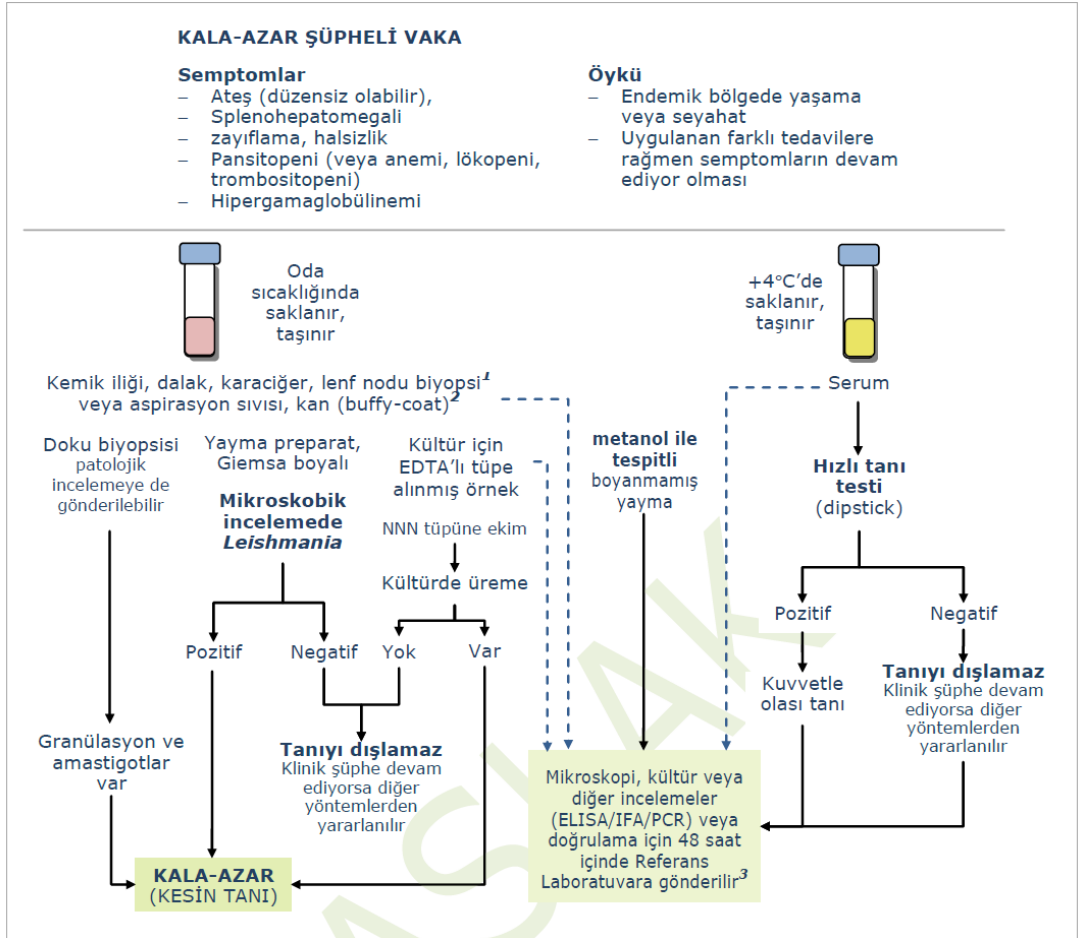
Ülkemizde leishmaniosis hastalığını kontrol altına almak ve hastalığın ülkemizde yayılmasını önlemek amacıyla, Suriyeli mülteciler için Barınma Merkezi bulunan illerde (Adana, Adıyaman, Gaziantep, Hatay, Kahramanmaraş, Osmaniye, Kilis, Şanlıurfa, Malatya ve Mardin) kutanöz leishmaniosis taramaları yapılmıştır. Adıyaman ilinde bu taramalara ilave olarak visseral leishmaniosis ile ilgili araştırma yapılmıştır. Özellikle hastalığın yaygın olduğu bölgelerde halkı bilinçlendirmek ve farkındalığı artırmak amacıyla şark çıbanı ile ilgili Türkçe ve Arapça broşürler hazırlanmış ve Halk Sağlığı Müdürlüklerine gönderilmiştir. Yine sağlık çalışanlarının ve halkın farkındalığını artırmak amacıyla Mardin ilinde sıtma ve leishmaniosis hastalıklarının değerlendirildiği “Vektörle Bulaşan Hastalıklar Sempozyumu” düzenlenmiştir (THSK, 2014).

1.8. Tanı

Kala-Azar hastalığının kesin tanısı laboratuvar incelemesi ile konur (WHO, 2010). Laboratuvar tanısı başlıca çeşitli doku örneklerinde amastigotların varlığının gösterilmesine veya kültürlerde üreme sonucu promastigotların gözlenmesine dayanır (Jeronimo ve ark., 2005). Tanıda, kemik iliği başta olmak üzere, dalak, karaciğer, lenf nodlarından aspirasyon sıvıları veya biyopsi örnekleri, kan gibi klinik örnekler kullanılır. Bunlar arasında etkenin en yüksek olasılıkla saptanabildiği organ dalak olmakla birlikte, komplikasyon riski yüksek olduğu için, alınması daha az riskli olan kemik iliği aspiratı tercih edilmektedir (HPA UK, 2014). Tanıda klinik örneklerden yapılan Giemsa boyalı preparatların mikroskopik incelemesi, kültür, PCR ve serolojik yöntemler kullanılabilir. Amastigotlar periferik kanda bulunabilirlerse de en sıklıkla dalak, kemik iliği veya lenf nodu aspiratlarının mikroskopisinde gözlenebilirler. Kültür, PCR veya hayvan (hamster) inokülasyonu ise özellikle enfeksiyonun erken

döneminde, parazit yükü düşük iken oldukça kullanışlı tekniklerdir. **Doku aspiratları veya biyopsi örneklerinde amastigotların görülmesi “altın standart” olarak kabul edilmektedir.** *Leishmania* kökenleri tür düzeyinde mikroskopi ile ayırt edilemez. Hastanın kliniği yol gösterici olsa da kesin tür ayrımı için moleküler yöntemler kullanılır (Özbel ve Töz, 2011). Moleküler teknikler için örnekler EDTA içeren tüplerde tam kan/kapiller kan, biyopsi ve aspirasyon sıvısı ve/veya boyanmamış preparatlar olabilir. *Leishmania* kökenlerinin tür düzeyinde tanımlanmasında yaygın kullanılan standardize bir protokol bulunmamaktadır. Moleküler yöntemlerin özellikle AIDS hastalarında VL tanısında serolojiden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Cota ve ark., 2012). Seroloji VL tanısında kullanışlı bir yöntemdir. Serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllükleri kullanılan antijene göre değişir. Amastigot antijeni K39’un rekombinantı olan rK39 antijenini kullanan serolojik testler ile promastigot antijenlerini kullanan DAT, IFAT, ELISA gibi testler arasında, rK39 hızlı tanı testinin (“dipstick” test) ve direkt aglütinasyon testinin (DAT) en yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilmektedir. IFAT testi de bu iki teste yakın sonuçlara sahiptir (Maia ve ark., 2012). “Dipstick” testi özellikle hastalığın endemik bölgelerde tanının yaygınlaşmasını sağlaması açısından önemlidir.

Kala-Azarın tanısı için alınabilecek örnekler ve tanı yöntemleri için akış şeması Şekil 1.11’de verilmektedir.

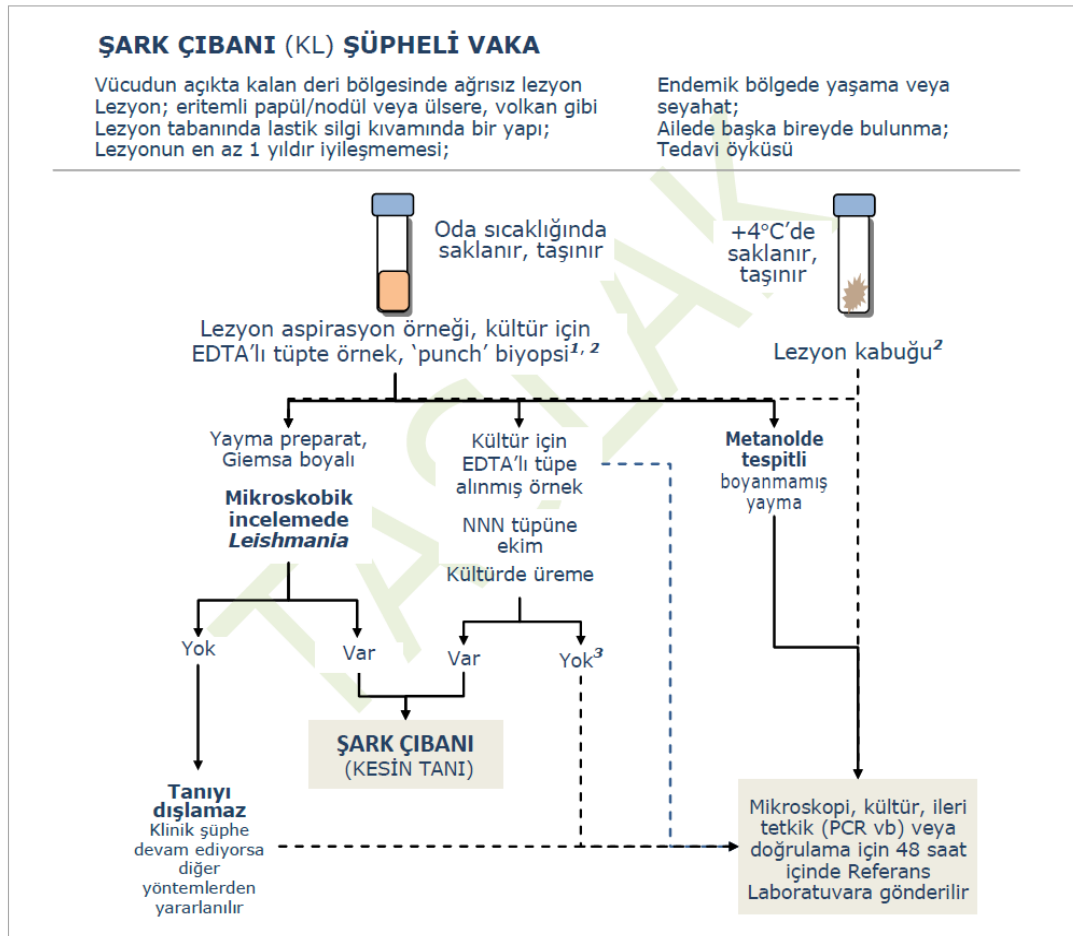


Şekil 1.11. Kala-Azarin tanısı için alınabilecek örnekler ve tanı yöntemleri için akış şeması. ¹Taze biyopsi hemen laboratuvara ulaştırılmayacaksa temiz lamlara bastırarak preparat hazırlanır. Biyopsi ya da aspirasyon örnekleri iki adet NNN tüpüne alınır. NNN tüpleri önceden laboratuvarından temin edilmiş olmalıdır. NNN yoksa biyopsi ya da aspirasyon örneği nötral pH'da, tamponlu steril bir ortama (tamponlu SF, RPMI, Eagle, Schneider, Tobie vb.) alınır ve oda sıcaklığında en fazla 48 saat içinde gönderilirler. ²Örnekler ikiye bölünmelidir. ³Örnekler alındıktan sonra Referans laboratuvarına doğrudan da gönderilebilir (UMS, 2015a).

Şark çıbanı tanısında, endemik bölgede yaşama veya seyahat öyküsü ile birlikte yüz, boyun, kol veya bacak derisinde tipik olarak nodül şeklinde başlayan ve zamanla ülserleşen bir veya birden fazla lezyonun gelişmesi hastalığı düşündürse de kesin tanı laboratuvar incelemesi ile konur (Jeronimo ve ark., 2005).

Hastalığın tanısı başlıca şüpheli lezyon örneklerinin Giemsa boyalı preparatlarının mikroskopik incelemesine dayanmaktadır. KL tanısı, deri kazıntılarından veya biyopsi örneklerinden hazırlanan Giemsa, Leishman veya benzeri bir boya ile boyanmış preparatlarda parazitin görülmesi ile doğrudan konabilir. Yeni ya da aktif lezyonlarda amastigotları bulmak kolaydır. Ülserli lezyon kazıntıları da

pozitif olabilir. Örneklerden kültür yapılabilir. Bu amaçla VL için önerilen besiyerleri kullanılabilir (Bullock-Iacullo, 1992). Serolojik testlerin KL tanısında yeri yoktur. Şark çıbanında lezyondan yapılan yaymalarda *Leishmania* amastigotlarının görülmesi kesin tanı koydurucu olduğu için, şüpheli olgularda **öncelikli** tanı yöntemi Giemsa boyanmış yaymaların incelenmesidir. Diğer yöntemler daha çok yaymalarda amastigot görülmediğinde kullanılır. Laboratuvar incelemeleri için bir akış şeması Şekil 1.12’de verilmiştir.



Şekil 1.12. Şark çıbanının tanısında alınabilecek örnekler ve tanı yöntemleri için akış şeması. ¹ Taze biyopsi hemen laboratuvara ulaştırılmayacaksa temiz lamlara bastırarak preparat hazırlanır. Biyopsi ya da aspirasyon örnekleri iki adet NNN tüpüne alınır. NNN tüpleri önceden laboratuvarından temin edilmiş olmalıdır. NNN yoksa biyopsi ya da aspirasyon örneği nötral pH’da, tamponlu steril bir ortama (tamponlu SF, RPMI, Eagle, Schneider, Tobie vb.) alınır ve oda sıcaklığında en fazla 48 saat içinde gönderilirler. ²Bu örnekler, lezyonun ve ilgili merkezin/laboratuvarın koşulları uygun ise alınmalıdır. ³Klinik şüphe devam ediyorsa yeni örnek alınıp incelenir veya diğer yöntemlerden yararlanılır (UMS, 2015b).

1.8.1. Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırılması

1.8.1.1. Mikroskopik Yöntem

Parazit boyutlarının çok küçük olması nedeniyle mikroskopik bakışı deneyim gerektirmektedir. Parazitin kültürü ise yine deneyim gerektirmesinin yanı sıra zahmetli ve zaman alıcıdır. Bu yöntemlerin uygulanabilmesi için parazitin yerleştiği organdan örnek alınması gereklidir (VL de kemik iliği aspirasyonu, KL ve mukokutanöz leishmaniosis'de (MKL) lezyon aspirasyonu gibi). VL tanısında mikroskopi ve kültürün duyarlılığı, serolojik ve moleküler yöntemlere göre daha düşük, KL'de ise serolojik yöntemlerden yüksek, moleküler yöntemlerden düşüktür (Desjeux, 2004; Jaffe, 2007).

1.1.8.2. Kültür

Kültürün avantajı parazitin izole edilebilmesidir. Parazit izole edilebilirse referans laboratuvarına gönderilerek daha sonra izoenzim analizi ile parazitin tür tayini yapılabilmektedir. Tedavi takibinde hassasiyetleri parazit sayısının azalması ile birlikte diğer yöntemlere göre daha da düşmektedir ve VL'de tekrarlayan kemik iliği aspirasyon uygulaması serolojik yöntemlere göre daha invazifdir (Desjeux, 2004; Jaffe, 2007).

1.1.8.3. Serolojik Yöntemler

1980'li yıllardan itibaren yüksek hassasiyet ve özgüllükleri ile direk tanının yanında önem kazanmışlardır. Rekombinant bir proteinin üretimi ile birlikte hızlı tanı testi (rK39 dipstick) tüm dünyada standart olarak uygulanabilir hale gelmiş, ancak yapılan çalışmalarda hastalığı oluşturan *Leishmania* türüne göre değişen farklı hassasiyet oranları elde edilmiştir. Parazitin endemik olduğu ülkelerde rutin laboratuvarlarda ve sahada uygulama kolaylığı avantajı sağlamaktadır. Serolojik

testler ile tedavi takibinde, antikor titrelerinin uzun süreli pozitif kalması nedeniyle ancak hastadan alınan ardışık serumların paralel çalışılması ile sonuç alınabilmektedir (Desjeux, 2004; Jaffe, 2007).

1.1.8.4. Moleküler Yöntemler

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) şu anda dünyada leishmaniosis tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır ve klasik tanı yöntemleriyle PCR sonuçlarının karşılaştırıldığı birçok araştırma yayınlanmıştır. Parazitin direkt DNA'sının saptandığı PCR yönteminin duyarlılığı serolojik yöntemlerden yüksektir. Parazit kromozomal DNA'sı ve kinetoplast DNA'sı, intergenik ve protein kodlayan DNA bölgelerini hedef alan çok sayıda PCR yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemlerin çoğu *Leishmania* cinsine özgül olup PCR-RFLP (PCR ve restriksiyon enzim analizi) gibi bazıları da diğer yöntemlerin eklenmesiyle etken olan *Leishmania* türünün tanımlanmasını da sağlamaktadırlar. Son yıllarda kantitatif nükleik asit dizi tespitine dayalı amplifikasyon (QT-NASBA) ve gerçek zamanlı PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler yüksek hassasiyet ve özgüllüklerinin yanı sıra, ilaç tedavisi sırasında parazit yükünün takibini ve ilaç direncinin hızlı tanımlanmasını da sağlamaktadırlar. Tedavi takibinde "buffy coat" örneklerinin kullanılması nedeniyle, kemik iliği mikroskopisinin ve ardışık serum örneklerin saklanması gibi zahmetli ve invazif olan klasik yöntemlere göre avantaj sağlamaktadır. Antikor yanıtının düşük olabildiği immün yetmezlikli hastalarda da (HIV+VL gibi) tanıda serolojik yöntemlere göre avantaj sağlamaktadır. Donanımlı bir laboratuvar gerektirmesi nedeniyle her rutin laboratuvarında uygulanamamaktadır (Desjeux, 2004; Jaffe, 2007).

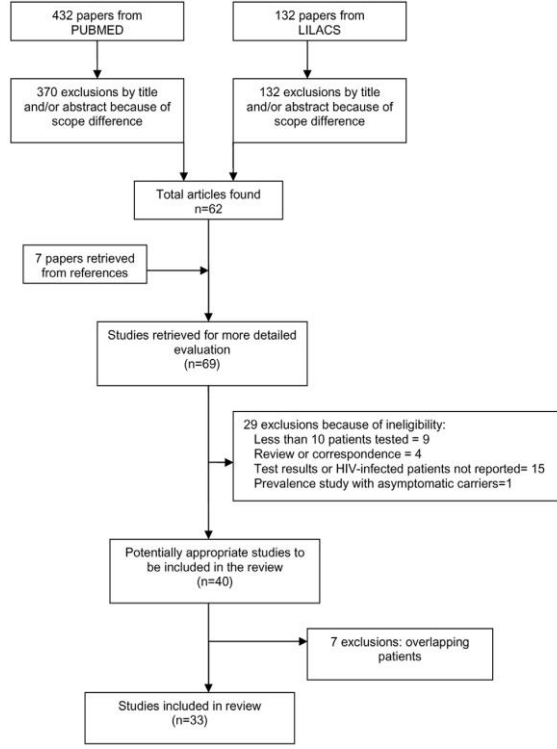
1.1.8.5. Serolojik ve Moleküler Yöntemlerin Tanısal Geçerliliğinin Karşılaştırılması

Cota ve ark. (2012), tarafından yapılan kapsamlı meta-analitik bir çalışmada HIV ile enfekte VL hastalarının tanısında serolojik ve moleküler yöntemlerin tanısal

geçerliliği karşılaştırılmıştır. Fetal bir hastalık olan insan VL'nin HIV ile enfekte hastalarda önemli bir fırsatçı enfeksiyon olarak ortaya çıkışı, son zamanlarda bu hastalığa dikkati daha fazla çekmiştir. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda, serolojik tanı yöntemleri doğru bir tanı aracı olarak kabul edilemeyeceği aşıkardır. Moleküler yöntemler ise VL tanısında umut verici görünmektedir.

Cota ve ark. (2012), tarafından yapılan bu derlemede, PubMed ve LILACS veritabanları taranmış ve çalışmaların kalitesi QUADAS (Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies) skoru ile değerlendirilmiştir. Duyarlılık ve özgüllükleri ayrı ayrı doğruluk ölçüm teknikleri [DOR (diagnostic odds ratio) ve sROC (symmetric summary receiver operating characteristic)] kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Toplam 1489 hastanın değerlendirildiği 33 çalışma bu derlemenin kapsamına alınmıştır (şekil 1.13). İmmüofloresan antikor (IFA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunoblotting (Blot), direkt aglutinasyon testi (DAT) ve tam kan ve kemik iliğinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri karşılaştırılmıştır (şekil 1.14). Çalışmaların çoğu Avrupa'da yürütölmüştür.



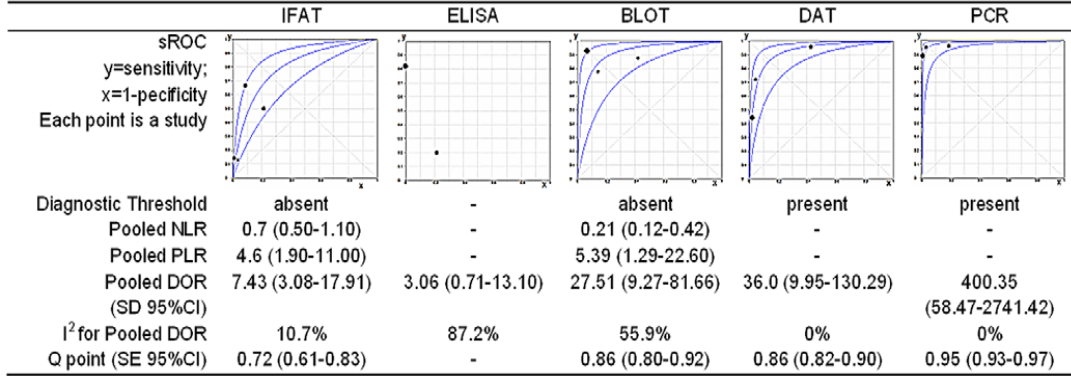
Şekil 1.13. Çalışmaların seçim süreci (Cota ve ark., 2012).

Serolojik testlerin performansı çok değişken olmakla birlikte duyarlılığı genel olarak sınırlı bulunmuştur:

- IFAT yönteminin duyarlılığı oldukça düşük olup, %11-82 arasında değişkenlik göstermektedir.
- DAT 36,01 (9,95-130,29) ve Blot 27,51 (9,27-81,66) yöntemlerinin DOR değeri (%95 güven aralığı, CI)'u, IFAT 7,43 (3,08-1791) ve ELISA 3,06 (0,71-13,10) yöntemlerinden daha yüksek bulunmuştur.
- Tam kanda PCR yönteminin performansı oldukça yüksek [DOR: 400,35 (58,47-2.741,42)] bulunmuştur. Q-point temelli PCR yönteminin doğruluğu 0.95; % 95 CI 0,92-0,97 bulunmuş olup, bu testin performansının iyi olduğu anlamına gelmektedir.

Sonuç olarak, klinik tanıda *Leishmania* enfeksiyonu düşünülüyorsa, serolojik testler HIV ile enfekte hastalarda VL tanısı ekarte etmek için kullanılmamalıdır. Zira

bu testler, klinik vaka tanımı ile kombine edildiğinde bile düşük titrelere sahiptir. Buna karşın moleküler testler son derece hassas bulunmuş ve tanısal çalışmalara katkıda bulunabileceği değerlendirilmiştir (Cota ve ark., 2012).



Şekil 1.14. Test performanslarının özeti. İmmüno Floresan antikor testi (IFAT), Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Immunoblotting (BLOT), direkt ağıltinasyon testi (DAT) ve tam kanda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), standart sapma (SD), %95 confidence interval=güven aralığı (%95 CI), *standart hata (SE). Diagnostic odds ratio (DOR): TP/FP:FN/TN (TP: Doğru pozitif, FP: Yanlış pozitif, FN: Yanlış negatif, TN: Doğru negatif). Symmetric summary receiver operating characteristic (sROC): ROC eğrisi, doğru pozitiflerin yanlış pozitiflere bölümü ile elde edilen grafik olup, yukarıdaki grafiklerde her bir ölçüm nokta ile gösterilmiştir ve ELISA dışındaki grafiklerde ROC eğrisi çizilmiştir (Cota ve ark., 2012).

1.1.8.6. Moleküler Tanı Testlerinin Geçerliliği

de Ruiter ve ark. (2014), tarafından yapılan meta-analitik bir çalışmada VL tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin geçerliliği değerlendirilmiştir. Bu derlemede 1256 makale incelenmiş, makaleler belirli kriterlere göre seçilmiş (Şekil 1.15), sonuç olarak kırk makale çalışmanın kapsamına alınmıştır.

Seçim kriterlerini karşılayan kırk çalışmada; PCR, gerçek zamanlı PCR, nükleik asit sekansına dayalı amplifikasyon (NASBA=nucleic acid sequence-based amplification) ve döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP=loop-mediated isothermal amplification) yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmaların duyarlılıklarının %29 ila 100 arasında, özgüllükleri ise %25 ila 100 arasında değiştiği görülmüştür. Tam kanda PCR yönteminin duyarlılığı %93,1 (%95 güven aralığı [CI], 90,0-95,2), özgüllüğü %95,6 (%95 CI, 87,0-98,6) arasında değerlendirilmiştir. Özgüllüğü consecutive (ardışık) çalışmalarda daha düşük [%63,3 (%95 CI, 71,8-53,9)] bulunmuştur. Özgüllüğün bu çalışmalarda oldukça düşük bulunması parazitolojik metodlarla (geleneksel) gerçek pozitif hastaların identifiye edilememesi ya da endemik

bölgelerde çok sayıda asemptomatik taşıyıcı bulunmasına bağlı olabilir. HIV-VL koenfeksiyonu olan hastalarda PCR yöntemi oldukça yüksek oranda doğru tanı koydurabilmekte olup, buffy coat ve kemik iliğindeki duyarlılığı %93,1-96,9 arasında değişmektedir.



Şekil 1.15. İncelenen çalışmaların iş akış şeması (de Ruiter ve ark., 2014).

Sonuç olarak;

- PCR kan ve kemik iliği örneklerinde *Leishmania* tanısında oldukça duyarlı bir yöntemdir. İmmünokompetan kişilerde de kan ve kemik iliğindeki PCR yönteminin duyarlılığı aşağı yukarı aynı bulunmuştur.
- Moleküler yöntemlerin özgüllüğü vaka-kontrol çalışmalarında yüksek olmasına karşın *consecutive* (ardışık) çalışmalarda daha düşük bulunmuştur.
- Moleküler yöntemler *Leishmania* tanısında son derece duyarlı olup, doğru bir şekilde yapılmış klinik vaka tanımı ile birlikte test algoritmasına katkıda

bulunabilir. Zira PCR pozitifliğinin her zaman diğer tanısal testler ve standart bir klinik vaka tanımı ile birlikte yorumlanması gerekir.

- Moleküler testler HIV ile enfekte VL hastalarının tanısında belirli bir değere sahip olabilir, ancak bu alanda herhangi bir öneri yapılmadan önce büyük ölçekli consecutive (ardışık) çalışmalarda yapılmasına ihtiyaç vardır.
- Son olarak, bu derleme consecutive (ardışık) çalışma yapılması, moleküler test protokollerinin standardize edilmesi ve diagnostik doğruluk çalışmalarının raporlanmasının geliştirilmesine olan ihtiyacı vurgulamaktadır (de Ruiter ve ark., 2014).

1.9. *Leishmania* Genomu

İnsan genom projesinin tamamlanması postgenomik alanın başlangıcı olmuştur. Biyolojik sistemlerin gelişimi ve ilerleyişi ile ilişkili düzenleyici ağlar (regülatör network) ve bu ağlarda rol oynayan fonksiyonel elementler tanımlanmaya başlanmıştır. Son yıllarda geliştirilen yeni nesil DNA dizileme teknolojisi (Next generation sequencing, NGS), genom üzerinde genetik/epigenetik düzenleyici ağların, kromatin yapısı, nükleer yapılanma ve genom varyasyonları (çeşitliliği) hakkında bilgi üretimini sağlayan önemli bir araç olmuştur. Yeni nesil DNA dizileme sistemleriyle yüksek doğrulukla, ultra hızlı olarak, dizileme yapılabilmektedir. Bu yöntemle elde edilen bir mikrobiyal genom dizisi araştırmacılara başka hiçbir deneysel yöntem ile elde edilemeyecek kadar zengin ve özgün bilgi sağlamaktadır.

Leishmania tüm genomu dizisinin (WGS) ilk kez çıkarılmasından bu yana sadece 10 yıllık bir zaman geçmiştir. Genomik ve transkriptomik analizler, *Leishmania*'nın biyolojisi ve parazit-konak-vektör üçgeni arasında meydana gelen karmaşık etkileşimleri daha iyi anlamamız için bizlere ışık tutmuştur (Cantacessi ve ark., 2015).

Leishmania genomu ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda; (i) Genetik çeşitliliğin ileri düzeyde olduğu görülmüş, taksonomisi güncellenmiştir. (ii) Atasal

DNA araştırmaları türlerin tarihsel ayrımlaşmasını ortaya koymuştur. (iii) *Leishmania* türlerinin biyolojisi ve parazit-konak-vektör çgeni daha iyi anlaşılmıştır. (iv) *Leishmania* türlerinin doku tropizminde ortaya çıkan farklılıkların nedenlerinin anlaşılabileceği düşünülmektedir. (v) NGS teknolojisini ilaç direnci biyomarker ve determinantlarının identifikasyonuna imkan vermektedir.

Günümüzde mevcut birkaç *Leishmania* türünün yüksek kalite ve tamamlanmış genomu (i) VL için, *L. infantum* JPCM5 (Peacock ve ark., 2007) ve *L. donovani* BPK282/0c14 (Downing ve ark.,2011), (ii) CL için, *L. major* Friedlin (Ivens ve ark., 2005), *L. mexicana* U1103 (Rogers ve ark., 2011), (iii) MCL için, *L. braziliensis* M2904 (Peacock ve ark., 2007), (iv) *L. tarentolae* (Raymond ve ark., 2012) ve (v) *L. amazonensis* (Real ve ark., 2013) şeklinindedir. Diğer *Leishmania* türlerinin parsiyel genom dizilerine TriTrypDB (www.tritrypdb.org) adresinden ulaşılabilir.

Ülkemizde *Leishmania* türlerinde yapılan herhangi bir “tüm genom sekansını” çalışması bulunmamaktadır. Günümüze değin ülkemizde yapılan veya Türkiye’den izolatların kullanıldığı birkaç moleküler tanı ve tiplendirme çalışmasından bazıları (i) Mikroskopi, ITS1-PCR, RFLP ve DNA Dizi Analizi yöntemleriyle Türkiye’nin güneyinden bazı *L. infantum* ve *L. tropica* izolatlarında genetik varyasyon ve klinik korelasyon değerlendirmesi (Eroğlu ve ark., 2015), (ii) Real-time PCR, DNA Dizi Analizi ve ELISA ile Ege bölgesindeki kedilerde VL araştırması (Paşa ve ark., 2015), (iii) Mikrosatellit analizi ile Güneydoğu Avrupa’da ve Balkanlarda *L. infantum* popülasyonunun genetiği alışması (Gouzelou ve ark., 2013), (iv) ITS1 PCR ve RFLP yöntemleriyle ülkemizde insan ve köpeklerde leishmaniosis moleküler karakterizasyonu (Toz ve ark., 2009) şeklinindedir.

Bu alışmada “Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi” ile Türkiye’de kutanöz leishmaniosis olgusundan izole edilen *Leishmania infantum*’un tüm genom dizisinin çıkarılması amaçlanmıştır. Çalışmanın CL etkeni *L. infantum* ile yapılacak olması çalışmayı daha özgün hale getirmektedir. Elde edilecek verilerin ülkemizde yapılacak olan *Leishmania* genom çalışmaları için bir temel oluşturacağı, küresel düzeydeki WGS çalışmalarına katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Tez çalışması projelendirilmiş olup (BAP Kabul tarihi: 28.03.2017, Kabul No: 17L0239002) “Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü” tarafından desteklenmektedir.

2.1. Örnek Seçimi

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2012-2017), Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı (MRLBÜDB) bünyesindeki “Ulusal Parazitoloji Referans Laboratuvarı”na Mersin’in Mut ilçesinden, Kutanöz Leishmaniosis ön tanılı 12 yaşında bir erkek hastadan izole edilen klinik örnek, mikroskopi kültür ve PCR yöntemleriyle *L. infantum* olarak tanımlanmış ve bu araştırmada tüm genom dizisi çıkarılmak üzere seçilmiştir.

2.2. DNA İzolasyonu

Doku örneği 180 mikrolitre ATL buffer içerisinde eritilerek homojenize edilmiştir. Homojenize dokudan DNA ekstraksiyonu spin kolon yöntemi ile QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden Germany) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen DNA örneği, yine MRLBÜDB bünyesindeki “Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı”na gönderilmiştir.

2.3. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Amplifikasyon ürününün konsantrasyonu Qubit 2.0 florometri cihazı ile Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) kiti kullanılarak ölçülmüştür. Yeni nesil dizileme uygulamalarında gerekli başlangıç DNA miktarı 100 ng’dir, örnek/ler toplam hacimde

100 ng olacak şekilde ayarlanır. Ancak seçtiğimiz hastaya ait DNA konsantrasyonu 0.7 ng/µl olarak ölçülmüş olup, bu konsantrasyon test için oldukça düşüktür. Şöyle ki; testte kullanılacak maksimum örnek volümü 50 µl olup, bu da yüklenebilecek maksimum DNA miktarının 35 ng olması anlamına gelmekte yani istenen başlangıç DNA miktarının ancak 1/3'ü elde edilebilmiştir. Ancak DNA konsantrasyonu düşük olsa da elimizdeki Türk hastadan izole edilen CL etkeni *L. infantum* için aşağıda verilen 2.4.1 maddesindeki kütüphane oluşturma çalışmaları yapılarak 2.4.1.10'daki kalite kontrol aşamasının sonuçlarına göre elimizdeki DNA ile çalışmaya devam edilip edilmemesine karar vermeyi öngördük. Buradan elde ettiğimiz verilere göre elimizdeki genomik DNA sekanslama için uygun bulundu ve bununla çalışmaların devam ettirilmesine karar verildi.

2.4. Yeni Nesil DNA Dizileme Uygulamaları

Genom dizileme işlemi, kimyasal sentezleme temelli yeni nesil DNA dizileme sistemi kullanan "Illumina HiSeq 2500" platformunda hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Dizileme kütüphanelerini oluşturmak için, "Illumina HiSeq 2500" platformuyla uyumlu "TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep Kit (Katalog No: 20015964; Illumina)" kullanılmıştır. Sentez ile dizileme (SBS, *sequencing by synthesis*), HiSeq Rapid SBS Kit v2 (Katalog No: FC-402-4023; Illumina) ile iki fragmanın uç uca birleştirilmesi ile edilen tek fragman okumaları (2 x 150 bp; PE, *paired-end*) şeklinde gerçekleştirilmiştir. Uygulama başlıca üç ana aşamadan oluşmaktadır. (i) Kütüphane oluşturma, (ii) Sekans reaksiyonu ve yürütme, (iii) Elde edilen sekans verilerinin biyoinformatik analizi.

2.4.1. Kütüphane Oluşturma

Kütüphane oluşturma için "TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep Kit (Katalog No: 20015964; Illumina)" kullanılmıştır. Uygulama, kit protokolünde

belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.1). Uygulanan adımlar aşağıda verilmiştir:

2.4.1.1. Genomik DNA (gDNA) Normalizasyonu

Genomik DNA 52,5 µl RSB (Tekrar Süspansiyon Tamponu) içerisinde toplam 35 ng DNA olacak şekilde seyreltilmiştir.

2.4.1.2. Mekanik Fragmentasyon

Fragmentasyon işlemi “TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep Kit (Katalog No: 20015964; Illumina)” ile uyumlu Covaris (Covaris Inc.) cihazı kullanılarak mekanik olarak yapılmıştır (350 bp boyutunda). 50 µl normalize gDNA Covaris cihazında, Covaris tüpleri içerisinde ultrasonikasyon ile kırılarak küçük parçalara ayrılmıştır. Covaris cihazı işletim parametreleri, ortalama 350 bp fragman elde edilecek şekilde, üretici talimatlarına göre ayarlanmıştır. Fragmentasyon sonucunda 3' ucu ve 5' ucunda *overhang* (çıkıntı) olan dsDNA elde edilmiştir.

2.4.1.3. DNA Fragmanlarının Temizlenmesi

Parçalanmış DNA'ların pürifikasyonu, kit içeriğindeki SPB (manyetik pürifikasyon boncukları) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 50 µl fragmente DNA 80 µl SPB'ye bağlanmış, %80 EtOH ile 2 defa yıkanmış ve son olarak 62,5 µl RSB içerisinde süspansiyon edilmiştir.

2.4.1.4. Fragmanların Tek Zincirli 3' ve 5' Uçlarının Küt Uçlara (Blunt-End) Dönüştürülmesi

Elde edilen DNA fragmanlarının kırık uçları kit içeriğinde bulunan End Repair Mix (ERP, uç tamir edici karışım) ile kör uçlara çevrilmiştir. Bu basamakta 40 µl ERP 62.5 µl temizlenmiş fragmante DNA ile karıştırılmış, ardından 30 dk inkübe edilmiştir. ERP karışımı bir yandan 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi ile tek zincirli 3' uçlarını parçalarken, diğer yandan 5'-3' polimeraz aktivitesi ile tek zincirli 5' uçlarının komplementerini sentezler.

2.4.1.5. 350 bp'den Büyük DNA Fragmanlarının Uzaklaştırılması

Bu amaçla 3/19 oranında seyreltilmiş SPB kullanılmıştır. Toplam 102,5 µl tamir edilmiş DNA fragmanı 190 µl seyreltilmiş SPB ile karıştırılmıştır. 5 dk inkübasyon ile büyük fragmanların SPB'ye bağlanması sağlanmıştır. Sıvı kısımda kalan ortalama 350 bp ve daha küçük DNA fragmanları yeni bir tüpe aktarılmıştır.

2.4.1.6. 350 bp'den Küçük DNA Fragmanlarının Uzaklaştırılması

Büyük DNA fragmanlardan temizlenmiş DNA'dan 250 µl alınarak 30 µl SPB ile karıştırılmıştır. Seyreltilmemiş SBP ile ortalama 350 bp büyüklüğündeki DNA fragmanları manyetik boncuklara bağlanmış, ardından %80 EtOH ile 2 defa yıkama yapılarak ortamdaki küçük fragmanlar uzaklaştırılmıştır. Son olarak 20 µl RSB içerisinde DNA yeniden süspense edilmiştir.

2.4.1.7. 3'-Uçların Adenilasyonu

Bu basamakta küt uçlu (blunt ended) DNA fragmanlarının 3' ucuna "adenin" nükleotidi eklenmektedir. Bu sayede adaptör ligasyonu aşamasından fragmanların

kendi arasında birbirine bağlanması engellenmekte, böylelikle kimerik oluşumların önüne geçilebilmektedir.

Küçük ve büyük fragmanlardan temizlenmiş 20 µl küt uçlu DNA süspansiyonu 12.5 µl ATL (adenin ekleme karışımı) ile karıştırılarak 37°C'de 30 dk ve ardından 70°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Böylece terminal deoksinükleotid transferaz (TdT) enziminin küt 3' uçlarına adenin eklemesi sağlanmıştır.

2.4.1.8. Adaptör Ligasyonu

Kit içeriğinde bulunan Ligation Mix 2 kullanılarak DNA fragmanlarının uçlarına Barkod adaptörler eklenmiştir. Barkod adaptörler aracılığıyla DNA fragmanları Akış Hücrelerine (Flow Cell) bağlanmakta ve ayrıca barkod bölgesi ile de örneklerin birbirinden ayırt edilmesi sağlanmaktadır. Bu basamakta adenilasyonu yapılmış DNA'dan 2,5 µl alınarak 2,5 µl DNA adaptörü ve 2,5 µl ligasyon miksi ile karıştırılmış ve 30 dk inkübe edilmiştir. Ardından SPB ile iki defa yıkanmış ve 50 µl RSB'de süspansiyon edilmiştir. Yıkama işlemi ile adaptör eklenmemiş DNA parçaları ortamdaki uzaklaştırılarak ortamda sadece adaptöre bağlı olanlar kalmaktadır.

Bu aşamada; PE dizileme kütüphanelerini oluşturmak için aşağıda dizisi verilen adaptörün "T" ucu ile, adenilasyonu gerçekleştirilmiş ve dizilenecek DNA'nın "A" ucu ligasyon ile birbirine bağlanır. Aşağıda verilen adaptörde, altı çizili ve kalın yazılı adaptör dizileri birbirlerine komplementerdir. Üstte yer alan dizinin 3' ucundaki C ve T deki "*" "*phosphorothioate*" bağını simgelemektedir. Bu bağ T ucunun C'ye sıkı bir şekilde bağlanmasını sağlar. Altta verilen dizinin 5' ucundaki "P" ise fosfat grubunu simgeler ve ligasyon için gereklidir. **Barkod adaptörü dizileri aşağıda verildiği gibidir:**

5' A C A C T C T T T C C C T A C A C G A C G C T C T T C C G A T C * T 3'

3' G A G C C G T A A G G A C G A C T T G G C G A G A A G G C T A G - P 5'

2.4.1.9. Kütüphane Dizisinin Oluşturulması

Dizileme sırasında daha verimli sonuçlar elde edebilmek için kit içeriğinde bulunan “PCR Primer Kokteyl Miksi (PPC, *PCR Primer Cocktail*)” ve PCR Zenginleştirme Miksi (EPM, *Enhanced PCR Mix*) kullanılarak PCR yöntemi ile adaptör eklenmiş DNA fragmanlarının zenginleştirilmesi yapılır.

50 µl ligasyonu gerçekleştirilmiş adaptör-DNA fragmanları, 20 µl EPM ve 5 µl PPC karıştırılarak PCR ile amplifiye edilir. PCR reaksiyonda PE PCR Primer 1.0 ve PE PCR Primer 2.0 kullanılarak, Illumina HiSeq PE dizilemeleri için uygun kütüphane dizisi Çizelge 2.1 gösterilen oligonükleotit dizileri kullanılarak hazırlanır. PCR sonrası diziler 50 µl SPB ile pürifiye edilir ve ardından 30 µl RSB içerisinde süspansiyon edilir.

Çizelge 2.1. Kütüphane Dizisi Oluşturmada Kullanılan Primerler ve Dizileri.

Primerler	Oligonükleotit Dizileri (5'-3')
Okuma Primeri 1	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
Okuma Primeri 2	CGGTCTCGGCATTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT
P5 İndeks	AATGATACGGCGACCACCGA
P7 İndeks	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT
PE PCR Primer 1.0	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
PE PCR Primer 2.0	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT

Kütüphane Dizisi (5'-3'): (P5)-(GATCT)-(Okuma Primeri 1 ters komplementer)-(DNA)-(Okuma Primeri 2)-(P7 dizisi ters komplementer) şeklinde oluşturulur.

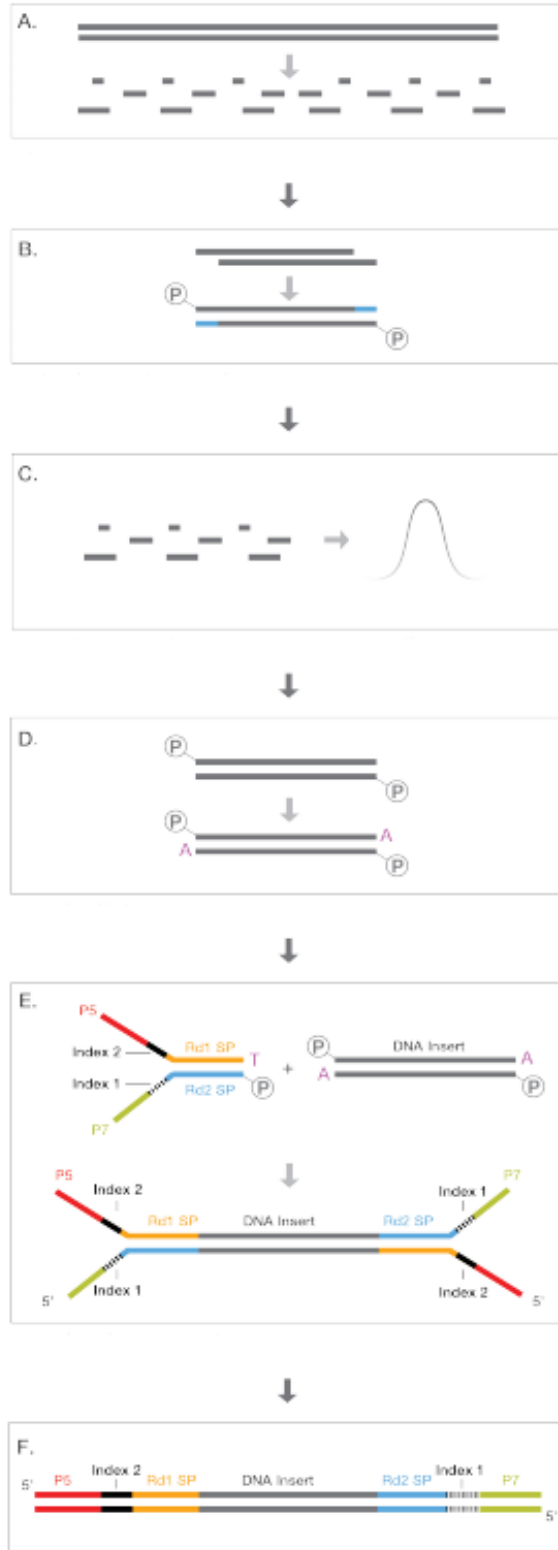
2.4.1.10. Kütüphane Kalite Kontrolü ve Normalizasyonu

Bu basamakta, DNA kütüphanesinin kantitasyonu için qPCR yöntemi kullanılarak optimum boyut kümelemesi yapılmıştır. 350 bp kütüphane için, ligasyondan sonra 470 bp ortalama boyut elde edilmesi gerekmektedir.

Son olarak örneklerin kalite kontrolü, Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer ile yapılarak boyut dağılım profilleri elde edilmiş ve böylece boyut dağılımı ve DNA miktarının kontrolü yapılmıştır.

Kütüphane normalizasyonu için seyreltme tamponu (Tris-HCl 10 mM, pH 8.5, 0.1% Tween 20) kullanılarak DNA kütüphanesi konsantrasyonu 10 nM'a seyreltilmiştir.





Şekil 2.1. Kütüphane Oluşturulması: **A.** Genomik DNA'nın fragmentlere ayrılması, **B.** DNA fragmentlerinin küt uçlu hale getirilmesi, **C.** Pürifikasyon ile yaklaşık 350 bp büyüklükteki DNA fragmentlerinin büyük ve küçük olanlardan ayrılması, **D.** Adenilasyon, **E.** Barkod adaptörlerin ligasyonu, **F.** Kütüphane dizisi (Illumina, 2018).

2.4.2. Sekans Reaksiyonu ve Yürütme

DNA dizileme “HiSeq Rapid SBS Kit v2 (Katalog No: FC-402-4023; Illumina)” kullanılarak HiSeq 2500 platformu ve bununla uyumlu cBot cihazı (Illumina) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Uygulama, kit protokolünde belirtildiği şekilde yapılmış olup, işlem basamakları aşağıda anlatıldığı gibidir:

2.4.2.1. DNA Kütüphanelerinin Akış Hücresi (Flow Cell) Yüzeyine Bağlanması ve Kümelerin Oluşturulması

DNA kütüphanesi akış hücreesine yüklenerek cBot cihazına yerleştirilmiştir. Döngü dizileme işleminde üretici firmanın talimatlarına göre “HiSeq Rapid SBS Kit v2” içeriğindeki AMS (hızlı amplifikasyon mixi), FDR (hızlı denatürasyon mixi), FLM1 (hızlı lineerizasyon mixi 1), FLM2 (hızlı lineerizasyon mixi 2), FPM (Hızlı Ön Mix), FRM (Hızlı tekrar sentez mixi), HP10 (Okuma Primeri 1), HP11 (Okuma Primeri 2), HP12 (İndeks Okuma Primeri 1) ve HT (hibridizasyon tamponu) reaktifleri kullanılmış ve PE dizilemeye uygun program seçilerek kümeleme başlatılmıştır.

Bu işlem esnasında; (i) HT1 reaktifi ile kütüphaneler akış hücreleri üzerindeki immobilize oligolara bağlanır. (ii) AMS ile serbest 3' ucundan polimeraz aktivitesi ile DNA sentezi yapılır. (iii) Kümelenme için ise döngüsel olarak köprü amplifikasyonu, denatürasyon, linearizasyon, 3' ucu bloklama, ters iplik denatürasyonu ve tekrar amplifikasyon işlemleri gerçekleştirilir. Bu döngüler sırasında AMS, FDR, FLM1, FLM2, FPM, FRM, HP10, HP11, HP12 ve HT reaktifleri aktif olarak kullanılır.

2.4.2.2. HiSeq 2500'ün Dizilemeye Hazırlanması

SBS kit reaktifleri HiSeq 2500 cihazına yüklenmiştir. Dizileme için kullanılacak kit ile uyumlu yürütme parametreleri seçilmiştir. Kalibrasyon akış hücresi cihaza yüklenmiş ve kalibrasyon gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon akış hücresi cihazdan çıkartılmıştır.

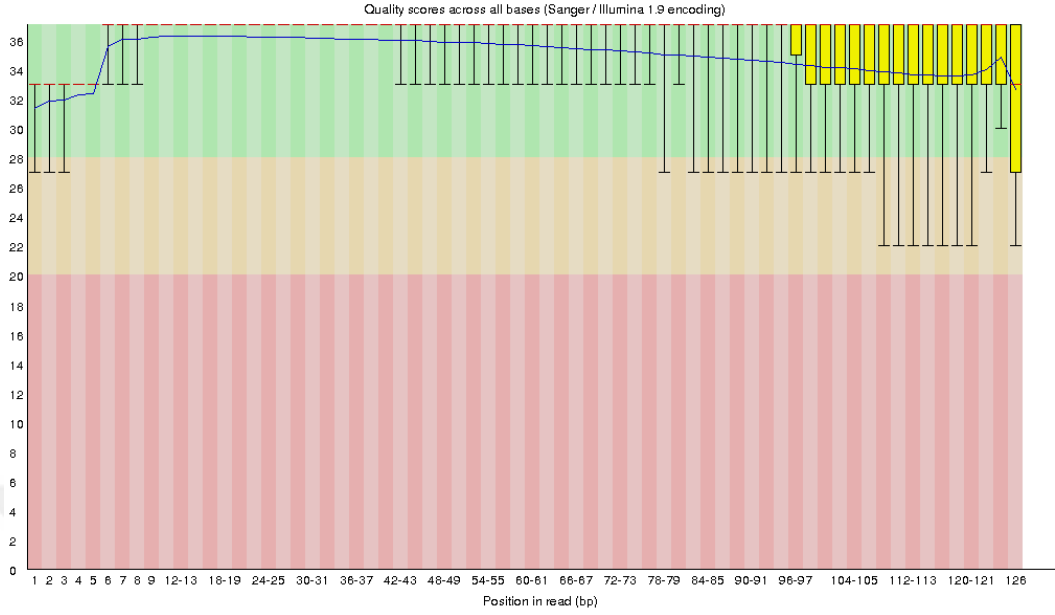
2.4.2.3. İlk Adımda Oluşturulan Akış Hücresi Üzerindeki Kümelerin Dizilenmesi

Akış hücresi HiSeq 2500 cihazına yerleştirilmiş ve yürütme ekranından dizileme başlatılmıştır. Dizileme sonunda tüm reaktifler cihazdan çıkartılarak uzaklaştırılmıştır.

2.4.3. Biyoinformatik Analizler

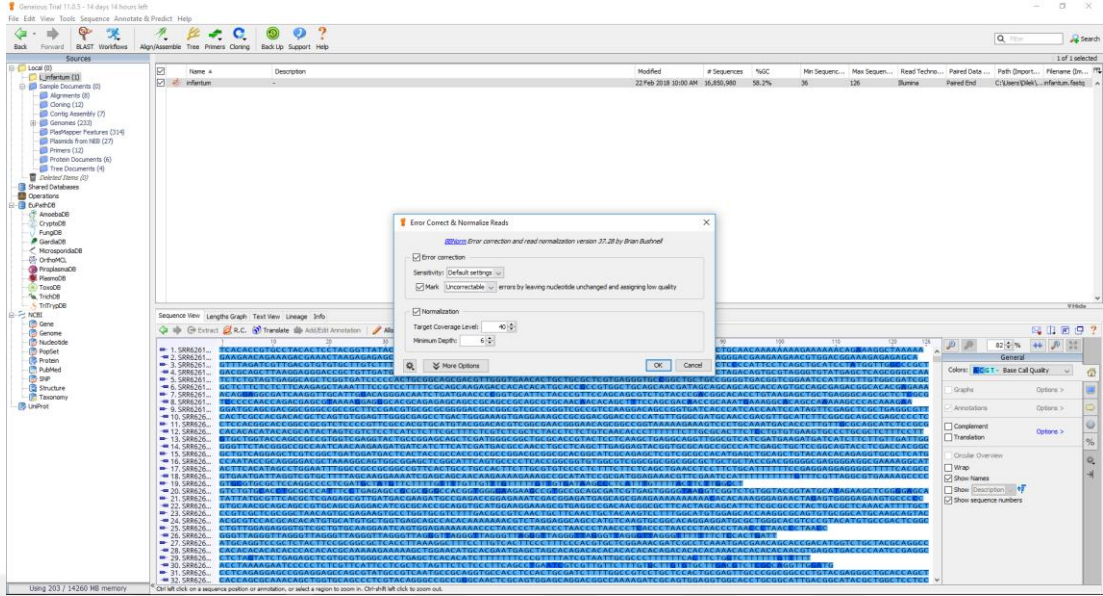
Elde edilen genom sekansları “FASTQ” formatındadır. Bu format sekans bilgisi ile birlikte kalite değerlerini de içermektedir. Kalite değerleri QC-0 ile QC-40 arasında olup, her bir sekans okumasındaki doğruluk oranını yansıtmaktadır. QC-20 %99, QC-30 ise %99,99 doğru baz okuma olasılığını temsil eder. Bu çalışmada elde edilen FASTQ dosyası web tabanlı Galaxy platformuna (<https://usegalaxy.org/>) yüklenerek kalite kontrol aşamasına geçilmiştir (Afgan ve ark, 2012; Galaxy, 2018). Galaxy platformunda bulunan “FastQC” aracı ile; sekans dosyasına ait basit istatistik, baz düzeyinde sekans kalitesi, sekans düzeyinde kalite değerlerinin dağılımı, baz ve sekans düzeyinde “GC” içeriği, okunamayan sekans içeriği, sekans uzunluk dağılımı, sekans tekrar düzeyi ve K-mer içeriği üzerine kalite raporu oluşturularak problemleri olabilecek kısımlar üzerinde hızlı bir değerlendirme yapılmıştır (Andrews, 2010). FastQC raporunda elde edilen sonuçlara göre sekansların GC oranı %58 olup, boyutu 36 bp–126 bp arasında toplam 16.850.980 adet sekans bulunmuştur. Sekansların %100’ü 22 kalite skorunun üzerinde elde edilirken, sekansların %93’ü 30 kalite skorunun üzerindedir. Sekansların %99’undan fazlası 120bp-126bp arasında olup farklı boyutlarda elde edilen sekansların oranı oldukça düşüktür. Covarage değeri toplam sekans sayısı ve ortalama sekans uzunluğunun çarpımının genom boyutuna bölünmesiyle elde edilmektedir. Elde edilen verilere göre covarage değeri 60 olarak hesaplanmıştır (Şekil 2.2).

Per base sequence quality



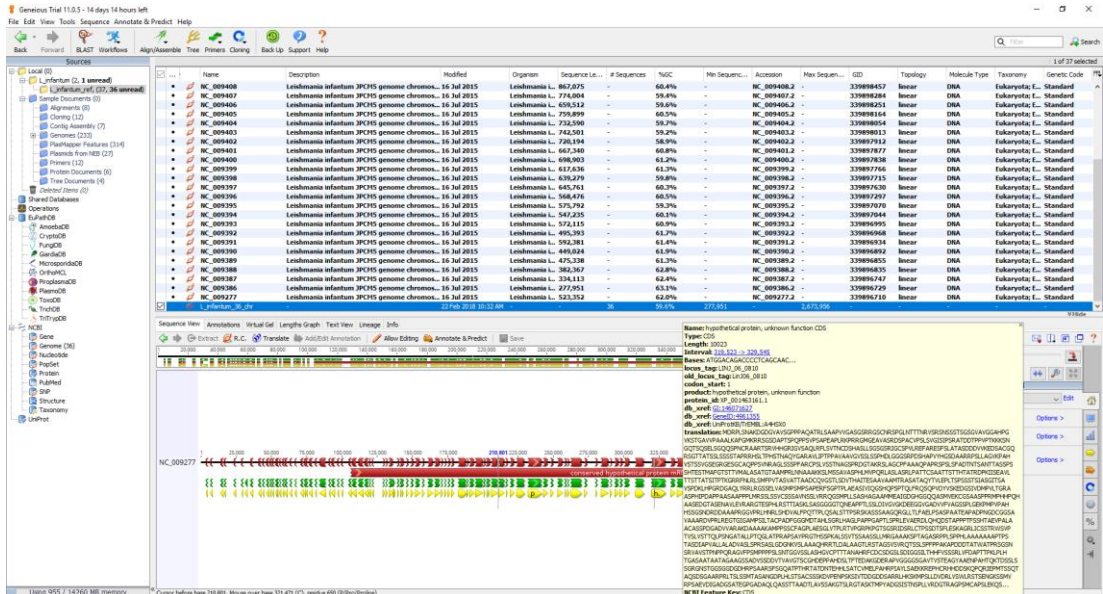
Şekil 2.2. QC Raporu. Toplam okunan DNA fragmenti: 16850980. DNA fragmentlerinin sekans uzunluğu: 36-26. QC skoru ortalama 35 civarında olup, bu da okumanın $>99,9\%$ doğrulukta olduğu anlamına gelmektedir.

FASTQ formatındaki sekans dosyaları paired end, illumina formatında Geneious 11.0.5. (<http://www.geneious.com>; Kears e et al., 2012) platformuna yüklenerek, ileri ve geri okumaların birleştirilmesi gerçekleştirilmiştir (Geneious, 2018). Elde edilen dosyada bulunan düşük kalite ve güvenilirlikteki sekansların filtrelenmesi amacıyla BBtools paketinden (<https://jgi.doe.gov/>) BBnorm aracı kullanılmıştır (JGI, 2018). BBnorm aracında minimum covarege 6, hedeflenen covarege ise 40 olarak seçilmiştir. Bu şekilde hatalı sekanslar filtrelenerek ve coverage değerleri normalize edilerek analizin doğruluğu arttırılmıştır (Şekil 2.3).



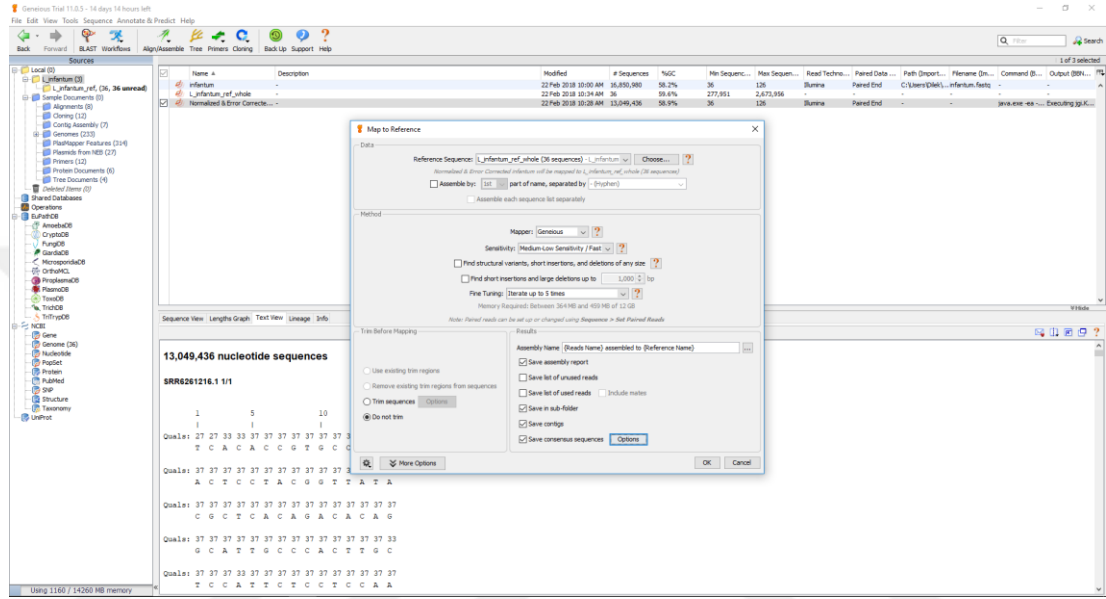
Şekil 2.3. BB tools aracı ile hatalı sekansların filtrelenmesi ve coverage değerlerinin normalizasyonu.

Genom haritalama (mapping) işlemi için referans genom olarak kullanılmak üzere *L. infantum* JPCM5 suşuna ait 36 kromozom sekansı Geneious platformuna indirilmiştir. 36 kromozom tek bir dosya içinde listelenerek referans olarak kullanılmaya hazır hale getirilmiştir (Şekil 2.4).



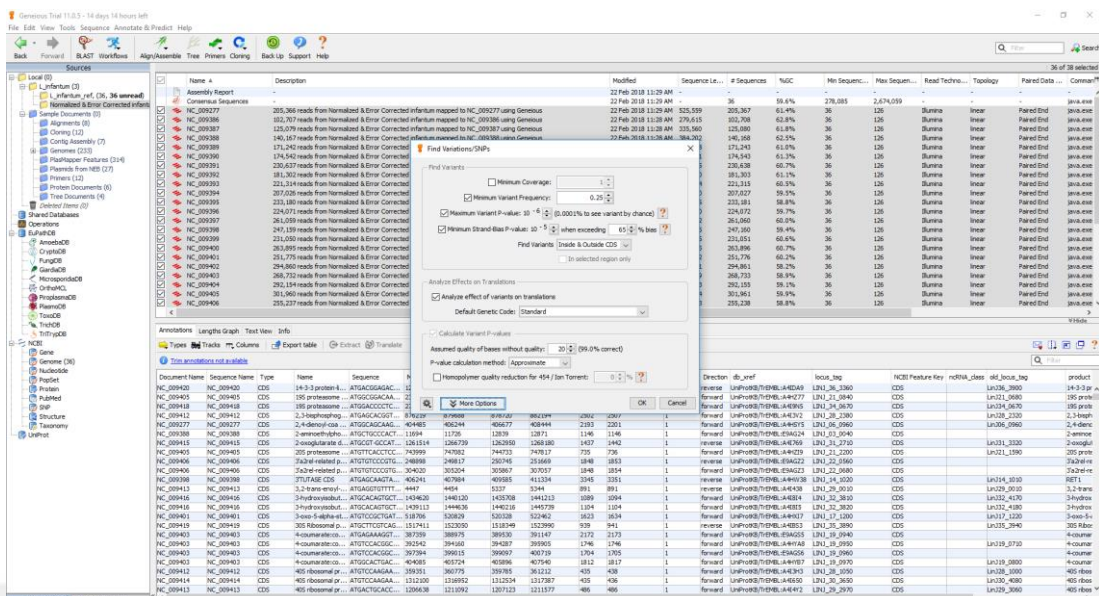
Şekil 2.4. Referans genomu ait 36 kromozomun tek dosya halinde listelenmesi.

Geneious mapper kullanılarak, orta hassasiyet ve 5 *iterasyon* parametreleri ile referansa karşı haritalama işlemi yürütülmüştür. Elde edilen kontig dosyaları kromozomlara göre sınıflandırılmış ve referans genoma göre anotasyonları yapılmıştır (Şekil 2.5).

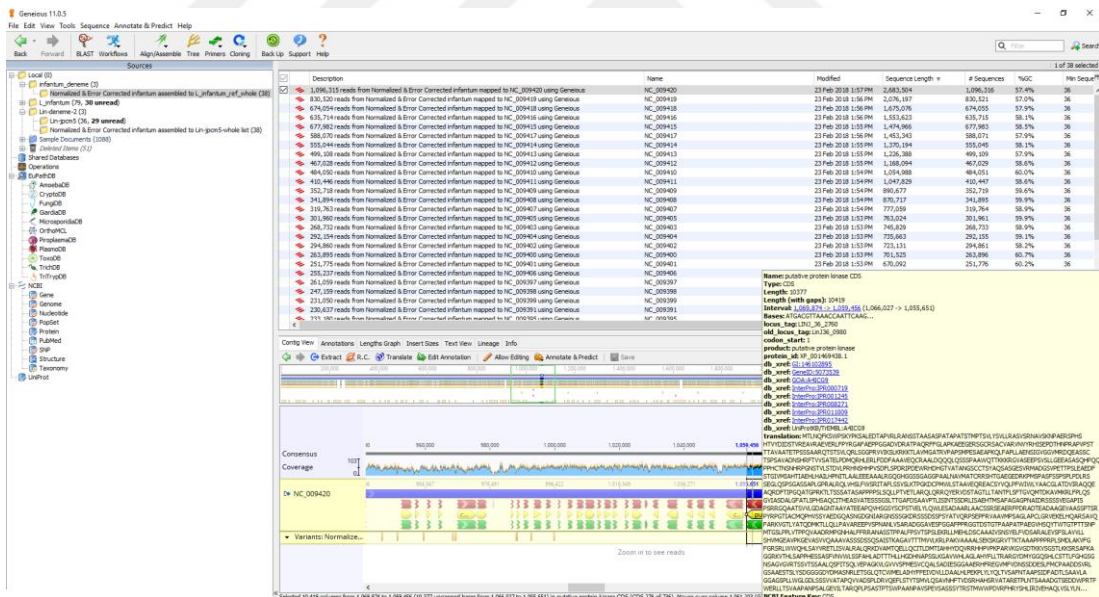


Şekil 2.5. Haritalama ve anotasyon.

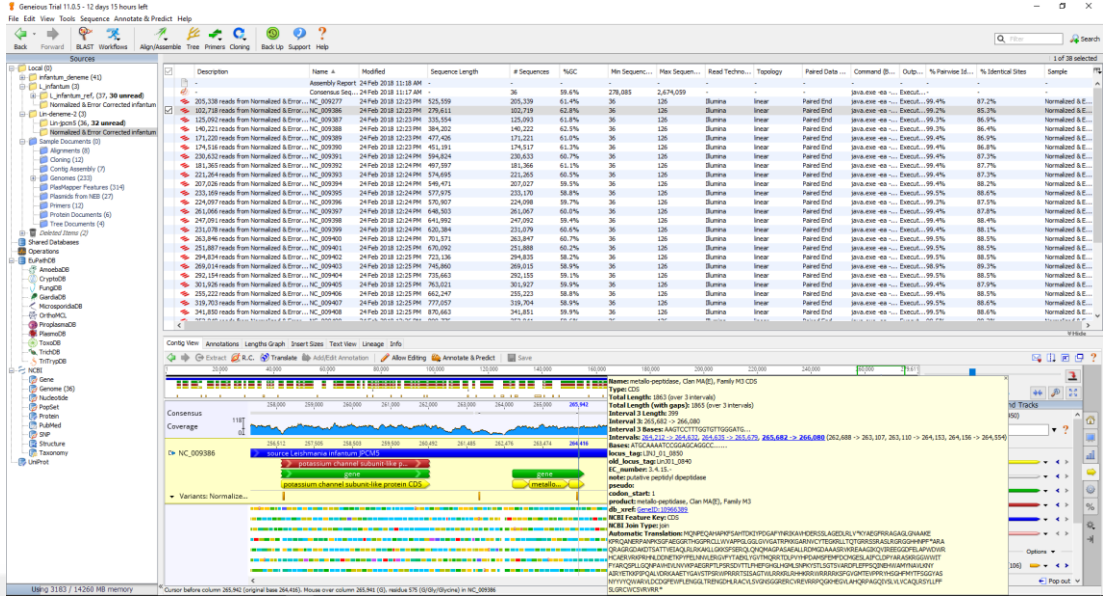
Geneious platformu üzerinde “Find Variations/SNPs” programı kullanılarak kromozomlara ait kontig dosyaları üzerindeki polimorfik bölgeler tespit edilmiştir (Şekil 2.6). Polimorfizm saptanan bazı bölgelerin değerlendirilmesi aşağıda örneklendirilmiştir (Şekil 2.7, 2.8, 2.9).



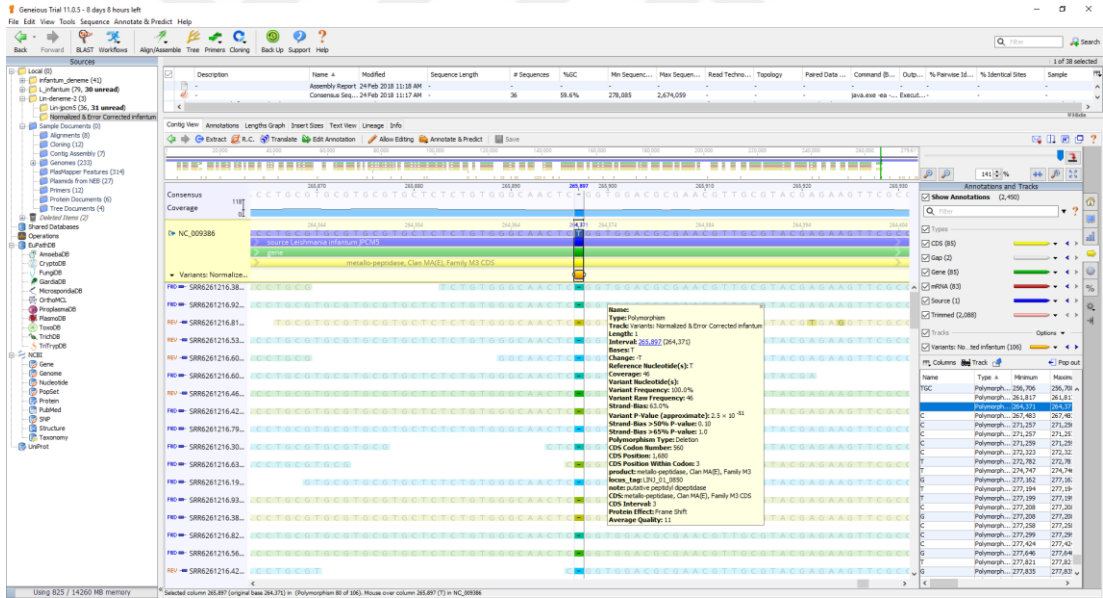
Şekil 2.6. Varyasyonların saptanması.



Şekil 2.7. Varyasyon analizi örneği. 12. Kromozom (NC_009396)-Yüzey antijeni geni (Putative surface antigen protein kinase, CDS) üzerinde frame-shift mutasyon bölgesinin saptanması.



Şekil 2.8. Varyasyon analizi örneği. 1. Kromozom (NC_009386)-Metallopeptidaz geni (metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3 CDS) üzerinde frame-shift mutasyon bölgesinin saptanması.



Şekil 2.9. Varyasyon analizi örneği. 1. Kromozom (NC_009386)-Metallopeptidaz geni (metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3 CDS) üzerinde frame-shift mutasyon bölgesinin incelenmesi.

Kontiglerden oluşturulan konsensüs sekanslar fasta formatında kaydedilerek NCBI veribankasına (www.ncbi.nlm.nih.gov) yüklenmiştir (NCBI, 2018a).

3. BULGULAR

Bu çalışmada *L. infantum*'un yüksek kalitede tüm genom dizisi başarı ile sekanslanmış ve 36 kromozoma ait toplam 32.009.138 baz çifti büyüklüğünde genomik DNA elde edilmiştir. Ardından elde edilen genomik DNA, *National Center for Biotechnology Information, USA, (NCBI) GenBank*'a (www.ncbi.nlm.nih.gov) yüklenerek ***Leishmania infantum*_TR01 (Lin_TR01)** ismi ile kaydedilmiştir (NCBI, 2018a). Lin_TR01 genomunun 36 kromozomuna ait NCBI tarafından verilen *accession* (erişim) numaraları "CP027807, CP027810, CP027808, CP027811, CP027809, CP027812, CP027813, CP027814, CP027817, CP027818, CP027819, CP027815, CP027821, CP027816, CP027823, CP027820, CP027822, CP027824, CP027825, CP027826, CP027827, CP027828, CP027829, CP027830, CP027831, CP027832, CP027833, CP027834, CP027835, CP027836, CP027837, CP027838, CP027839, CP027840, CP027841, CP027842" şeklindedir (Şekil 3.1) (NCBI, 2018b).

Günümüzde sadece birkaç tane yüksek kalite *L. infantum* tüm genomu mevcuttur. Bu çalışmada elde edilen *L. infantum* tüm genom dizisi ise; (i) referans genomdan bu yana elde edilen ikinci WGS, (ii) ülkemizde çıkarılan ilk WGS ve (iii) seviye olarak *complete* durumda olan tek WGS'dir (Şekil 3.2) (NCBI, 2018c).

Organism Overview : Genome Assembly and Annotation report

Leishmania infantum

Leishmania infantum Genome sequencing

Lineage: Eukaryota[3282]; Euglenozoa[46]; Kinetoplastida[44]; Trypanosomatidae[42]; Leishmaniinae[24]; Leishmania[15]; Leishmania[0]; Leishmania donovani species complex[2]; Leishmania infantum[1]

Summary

Submitter: Public Health General Directorate, National Parasitology Reference Laboratory
 Assembly level: Complete Genome
 Assembly: GCA_003020905.1 ASM302090v1 scaffolds: 36 contigs: 36 N50: 1,046,244 L50: 11
 BioProjects: PRJNA437593
 Statistics: total length (Mb): 32.0091
 GC%: 59.9625

Replicon Info

Loc	Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%
	Chr	1	-	CP027807.1	0.28	63.0
	Chr	2	-	CP027818.1	0.34	62.4
	Chr	3	-	CP027829.1	0.38	62.8
	Chr	4	-	CP027837.1	0.48	61.3
	Chr	5	-	CP027838.1	0.45	61.9
	Chr	6	-	CP027839.1	0.53	62.0
	Chr	7	-	CP027840.1	0.59	61.3
	Chr	8	-	CP027841.1	0.5	61.7
	Chr	9	-	CP027842.1	0.57	60.9
	Chr	10	-	CP027808.1	0.55	60.1
	Chr	11	-	CP027809.1	0.58	59.3
	Chr	12	-	CP027810.1	0.57	60.5
	Chr	13	-	CP027811.1	0.65	60.2
	Chr	14	-	CP027812.1	0.64	59.8
	Chr	15	-	CP027813.1	0.62	61.2
	Chr	16	-	CP027814.1	0.7	61.2
	Chr	17	-	CP027815.1	0.67	60.8
	Chr	18	-	CP027816.1	0.72	58.9
	Chr	19	-	CP027817.1	0.74	59.2
	Chr	20	-	CP027819.1	0.73	59.7
	Chr	21	-	CP027820.1	0.76	60.4
	Chr	22	-	CP027821.1	0.66	59.8
	Chr	23	-	CP027822.1	0.78	59.4
	Chr	24	-	CP027823.1	0.87	60.4
	Chr	25	-	CP027824.1	0.89	60.1
	Chr	26	-	CP027825.1	1.05	60.2
	Chr	27	-	CP027826.1	1.05	59.3
	Chr	28	-	CP027827.1	1.17	59.2
	Chr	29	-	CP027828.1	1.22	58.6
	Chr	30	-	CP027830.1	1.37	58.7
	Chr	31	-	CP027831.1	1.47	58.9
	Chr	32	-	CP027832.1	1.55	58.8
	Chr	33	-	CP027833.1	1.45	58.6
	Chr	34	-	CP027834.1	1.67	58.6
	Chr	35	-	CP027835.1	2.07	58.1
	Chr	36	-	CP027836.1	2.68	58.1

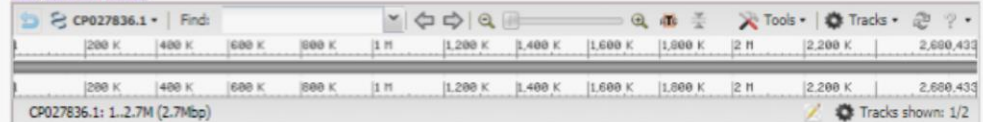
Chromosomes



Genome Region

Leishmania infantum strain TR01 isolate Lin_TR01 chromosome 36, complete sequence

Go to nucleotide: [Graphics](#) [FASTA](#) [GenBank](#)



Şekil 3.1. *Leishmania infantum*_TR01 (Lin_TR01) (NCBI, 2018b).

Organism/Name	Strain	BioSample	BioProject	Assembly	Level	Size (Mb)	GC%	Replicons	WGS	Scaffolds	Gene	Protein	Release Date	Modify Date	FTP
Leishmania infantum JPCMS	JPCMS	SAMEA1318175	PRJNA12658	GCA_90002875.2	●	32.1221	59.57	chromosome 1 NC_095366.2 FR756433.1 chromosome 2 NC_095367.2 FR756434.1 chromosome 3 NC_095368.2 FR756435.1 Show all 36 replicons	CACTR1	76	8366	8160	2007/04/04	2011/11/03	◆◆
Leishmania infantum TR01	TR01	SAMN05583618	PRJNA437593	GCA_90302995.1	●	32.0991	59.56	chromosome 1 CP927507.1 chromosome 2 CP927511.1 chromosome 3 CP927525.1 Show all 36 replicons		36	-	-	2018/10/27	2018/04/06	◆
Leishmania infantum		SAMEA153972945	PRJEB20254	GCA_90550925.1	●	32.8832	59.70		LINB01	36	8747	8526	2018/08/06	2018/08/06	◆
Leishmania infantum	HUFS14	SAMN0758840	PRJNA398352	GCA_903671315.1	●	32.5789	59.50		NSCOR1	2507	-	-	2018/10/22	2018/10/22	◆

Şekil 3.2. NCBI’da yer alan *L. infantum* WGS dizileri. *Leishmania infantum* TR01 bu çalışmada elde edilen WGS dizisini göstermektedir (NCBI, 2018c).

Leishmania infantum genomu anotasyonu sonucunda 36 kromozoma ait 3153 polimorfizm, 8324 Gen, 8199 CDS, 8109 mRNA, 67 tRNA, 11 rRNA ve 58 ncRNA bulunmuştur. Elde edilen 8199 CDS’nin 5278 tanesi hipotetik protein (Hypothetical protein CDS) niteliğindedir (Şekil 3.3).

Name	Type	Minimum	Maximum	Length	# Intervals	Direction	gene
conserved_hypothetical_protein_CDS	CDS	1,327,836	1,328,144	309	1	reverse	
putative basic transcription factor 3a CDS	CDS	1,437,362	1,437,893	532	1	forward	
conserved_hypothetical_protein_CDS	CDS	1,396,337	1,396,508	172	1	reverse	
histone H4 CDS	CDS	2,936	3,338	363	1	reverse	
hypothetical protein, unknown function CDS	CDS	79,465	798,944	380	1	reverse	
60S ribosomal protein L37a CDS	CDS	797,217	797,295	79	1	reverse	
conserved_hypothetical_protein_CDS	CDS	1,181,664	1,182,282	239	1	reverse	
LEPP12 CDS	CDS	2,187,179	2,187,448	267	1	reverse	LEPP12
putative 40S ribosomal protein S27-I CDS	CDS	1,435,020	1,435,380	361	1	forward	
putative cytochrome b5 CDS	CDS	1,883,052	1,883,291	240	1	forward	
hypothetical protein CDS	CDS	2,628,287	2,628,448	161	1	reverse	
putative ribosomal protein L39 CDS	CDS	1,330,513	1,330,745	233	1	reverse	
putative ribosomal protein L39 CDS	CDS	1,331,831	1,332,043	213	1	reverse	
putative nuclear protein Bcl6a (Hsp 70) CDS	CDS	94,128	94,619	492	1	reverse	
small nuclear RNA, U4 snRNA	snRNA	1,024,583	1,024,668	86	1	forward	
small nuclear RNA, U5 snRNA	snRNA	2,461,175	2,461,344	170	1	reverse	
snRNA	snRNA	933,689	933,707	19	1	forward	
snRNA-Leu	snRNA	2,462,264	2,462,285	82	1	reverse	
snRNA	snRNA	1,024,284	1,024,355	72	1	forward	
snRNA-Gln	snRNA	1,655,366	1,655,337	72	1	reverse	
snRNA	snRNA	2,462,347	2,462,318	72	1	reverse	
snRNA	snRNA	2,462,462	2,462,363	72	1	forward	

Şekil 3.3. Lin_TR01 şuşunun 36. kromozomu üzerindeki anotasyon örneği.

Bulunan 3153 polimorfik bölgenin 799’u *deletion* (delesyon, silinme), 528’u *insertion* (insersiyon, içe eklenme), 511’i *substitution* (substitüsyon, yer değiştirme) ve 1315’i ise SNP (tek nükleotit polimorfizmi) şeklindedir. Polimorfizmlerin 466’sının proteinler üzerine etkisi tespit edilmiş olup, bunların 3’ü delesyon, 5’i uzama

(*extention*), 44'ü çerçeve kayması (*frame shift*), 2'si insersiyon, 299'ü substitüsyon, 11'i *truncation* ve 102'si ise etkisiz (none) olarak sınıflandırılmıştır. Buradan da anlaşılacağı üzere proteinler üzerine etkili 364 polimorfizm bulunmakta olup, bu polimorfizmleri taşıyan kromozomal bölgelerin ürettikleri proteinlerin ise 166'sını fonksiyonu bilinen proteinler oluştururken; 198'ini hipotetik proteinler oluşmaktadır. Bu çalışmada tespit edilen 166 adet fonksiyonu bilinen protein üreten polimorfizm içeren bölge Çizelge 3.1'de özetlenmiştir. Çizelgede çok yüksek olasılıkla proteinin yapısını bozacak veya üretimini durduracak düzeyde değişikliğe yol açabilecek olan 26 adet “*frame shift, truncation* ve insersiyon” tipi polimorfizm “*” işaretiyle gösterilmiştir.



Çizelge 3.1. Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027807.1 /Chr 1	Deletion	264371	264371	1	T				Frame Shift	metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3
CP027829.1 /Chr 3	Deletion /tandem repeat	143240	143240	1	A		(A)3 -> (A)2		Frame Shift	putative 60S acidic ribosomal protein P2
CP027829.1 /Chr 3	Deletion	143258	143258	1	A				Frame Shift	putative 60S acidic ribosomal protein P2
CP027829.1 /Chr 3	Deletion /tandem repeat	143339	143339	1	C		(C)3 -> (C)2		Frame Shift	putative 60S acidic ribosomal protein P2
CP027829.1 /Chr 3	Deletion	143391	143391	1	C				Frame Shift	putative 60S acidic ribosomal protein P2
CP027829.1 /Chr 3	Deletion /tandem repeat	143400	143400	1	G		(G)4 -> (G)3		Frame Shift	putative 60S acidic ribosomal protein P2
CP027829.1 /Chr 3	Deletion	143416	143416	1	A				Frame Shift	putative 60S acidic ribosomal protein P2

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027840.1 /Chr 7	Deletion	519684	519684	1	G				Frame Shift*	putative nucleolar RNA-binding protein
CP027810.1 /Chr 12	Deletion	430384	430384	1	G				Frame Shift*	putative surface antigen protein 2
CP027812.1 /Chr 14	Deletion	292294	292294	1	A				Frame Shift*	beta-ketoacyl-CoA synthase
CP027839.1 /Chr 6	SNP /transversion	35293	35293	1	C	A	C -> A	M -> I	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily G, member1
CP027807.1 /Chr 1	SNP /transversion	29110	29110	1	C	A	C -> A	Q -> H	Substitution	glutaredoxin-like protein
CP027829.1 /Chr 3	SNP /transition	143389	143389	1	G	A	G -> A	G -> D	Substitution	putative 60S acidic ribosomal protein P2
CP027837.1 /Chr 4	Insertion	97429	97429	1	-	A			Frame Shift*	putative beta-fructofuranosidase

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027841.1 /Chr 8	SNP /transition	291420	291420	1	G	A	G -> A	G -> D	Substitution	amastin-like protein
CP027842.1 /Chr 9	SNP /transition	354732	354732	1	G	A	G -> A	P -> L	Substitution	polyubiquitin
CP027842.1 /Chr 9	SNP /transversion	537224	537224	1	T	A	T -> A	N -> Y	Substitution	putative ubiquinone biosynthesis protein-like protein
CP027808.1 /Chr 10	SNP /transition	162902	162902	1	G	A	G -> A	E -> K	Substitution	putative folate/biopterin transporter
CP027808.1 /Chr 10	SNP /transversion	162944	162944	1	T	A	T -> A	Y -> N	Substitution	putative folate/biopterin transporter
CP027808.1 /Chr 10	SNP /transversion	163058	163058	1	T	A	T -> A	S -> T	Substitution	putative folate/biopterin transporter
CP027808.1 /Chr 10	SNP /transversion	223677	223677	1	T	A	T -> A	F -> Y	Substitution	GP63, leishmanolysin

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027809.1 /Chr 11	SNP /transition	489877	489877	1	G	A	G -> A	G -> D	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily A, member2
CP027810.1 /Chr 12	SNP /transition	300315	300315	1	G	A	G -> A	V -> I	Substitution	glucose-6-phosphate isomerase
CP027810.1 /Chr 12	SNP /transition	388024	388024	1	G	A	G -> A	V -> M	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027810.1 /Chr 12	SNP /transversion	388091	388091	1	C	A	C -> A	T -> K	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027810.1 /Chr 12	SNP /transversion	388101	388101	1	C	A	C -> A	S -> R	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027812.1 /Chr 14	SNP /transition	483769	483769	1	G	A	G -> A	R -> Q	Substitution	putative kinesin K39
CP027812.1 /Chr 14	SNP /transition	486258	486258	1	G	A	G -> A	A -> T	Substitution	putative kinesin K39

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027819.1 /Chr 20	SNP /transition	386513	386513	1	G	A	G -> A	A -> T	Substitution	putative protein kinase
CP027823.1 /Chr 24	SNP /transition	770104	770104	1	G	A	G -> A	L -> F	Substitution	putative PI3-kinase
CP027825.1 /Chr 26	SNP /transition	254465	254465	1	G	A	G -> A		Truncation*	chaperone protein-like protein
CP027826.1 Chr 27	SNP /transversion	181105	181105	1	C	A	C -> A	P -> Q	Substitution	putative calpain-like cysteine peptidase
CP027826.1 Chr 27	SNP /transition	644540	644540	1	G	A	G -> A	V -> M	Substitution	putative amino acid transporter
CP027826.1 Chr 27	SNP /transversion	1021164	1021164	1	C	A	C -> A	D -> E	Substitution	WD-repeat protein
CP027827.1 /Chr 28	Insertion	564739	564739	1	-	A			Frame Shift*	putative target SNARE

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027827.1 /Chr 28	SNP /transition	1136928	1136928	1	G	A	G -> A	A -> V	Substitution	putative sodium/sulphate symporter
CP027831.1 /Chr 31	SNP /transition	519270	519270	1	G	A	G -> A	T -> I	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily C, member6
CP027832.1 /Chr 32	SNP /transversion	263889	263889	1	C	A	C -> A	A -> D	Substitution	putative RNA binding protein
CP027832.1 /Chr 32	SNP /transition	264164	264164	1	G	A	G -> A	V -> M	Substitution	putative RNA binding protein
CP027832.1 /Chr 32	SNP /transition	264224	264224	1	G	A	G -> A	E -> K	Substitution	putative RNA binding protein
CP027834.1 /Chr 34	SNP /transversion	121911	121911	1	C	A	C -> A	P -> T	Substitution	deoxyhypusine synthase
CP027834.1 /Chr 34	SNP /transversion	121926	121926	1	C	A	C -> A	R -> S	Substitution	deoxyhypusine synthase

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027835.1 /Chr 35	SNP /transition	207192	207192	1	G	A	G -> A	G -> S	Substitution	proteophosphoglycan ppg4
CP027835.1 /Chr 35	SNP /transition	743411	743411	1	G	A	G -> A	R -> K	Substitution	protein kinase-like protein
CP027835.1 /Chr 35	SNP /transition	1581464	1581464	1	G	A	G -> A	E -> K	Substitution	MAP kinase kinase-like protein
CP027836.1 /Chr 36	SNP /transition	575422	575422	1	G	A	G -> A	R -> C	Substitution	putative protein kinase
CP027836.1 /Chr 36	SNP /transition	1253290	1253290	1	G	A	G -> A	A -> V	Substitution	putative ADP-ribosylation factor GTPase activating protein
CP027810.1 /Chr 12	Substitution	388354	388355	2	TC	AA	TC -> AA	S -> K	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027841.1 /Chr 8	Substitution	291422	291423	2	GT	AC	GT -> AC	V -> T	Substitution	amastin-like protein

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027810.1 /Chr 12	Substitution	388297	388298	2	GT	AC	GT -> AC	V -> T	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027835.1 /Chr 35	Substitution	180007	180009	2	GG	ACA	GCG -> ACA	A -> T	Substitution	putative proteophosphoglycan ppg3
CP027829.1 /Chr 3	Substitution	143380	143381	2	GA	AG	GA -> AG	G -> E	Substitution	putative 60S acidic ribosomal protein P2
CP027810.1 /Chr 12	Substitution	388321	388323	3	GAG	AGC	GAG -> AGC	E -> S	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027810.1 /Chr 12	Substitution	388345	388348	3	CCG	AGGA	CGCG -> AGGA	RD -> RN	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027842.1 /Chr 9	Substitution	354738	354739	2	CC	AT	CC -> AT	G -> I	Substitution	polyubiquitin
CP027814.1 /Chr 16	Insertion /tandem repeat	660802	660802	1	--	AT	(AT)10 -> (AT)11		Frame Shift*	putative U1 small nuclear ribonucleoprotein

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027810.1 /Chr 12	Substitution	388364	388368	5	GGGTA	ATAAG	GGGTA -> ATAAG	RV -> NK	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027808.1 /Chr 10	Substitution	162979	162982	4	GCGC	ATAT	GCGC -> ATAT	LR -> LY	Substitution	putative folate/biopterin transporter
CP027839.1 /Chr 6	Substitution	35300	35304	4	GAAC	ATCAG	GAAAC -> ATCAG	VS -> LI	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily G, member1
CP027810.1 /Chr 12	Substitution	388312	388316	4	GCAT	ATTGC	GTCAT -> ATTGC	VI -> IA	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027839.1 /Chr 6	SNP /transversion	35286	35286	1	A	C	A -> C	S -> A	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily G, member1
CP027839.1 /Chr 6	SNP /transversion	35296	35296	1	A	C	A -> C	F -> L	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily G, member1
CP027841.1 /Chr 8	SNP /transversion	291403	291403	1	G	C	G -> C	K -> N	Substitution	amastin-like protein

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027841.1 /Chr 8	SNP /transversion	291470	291470	1	G	C	G -> C	E -> Q	Substitution	amastin-like protein
CP027842.1 /Chr 9	SNP /transition	354747	354747	1	T	C	T -> C	D -> G	Substitution	polyubiquitin
CP027809.1 /Chr 11	SNP /transversion	101036	101036	1	A	C	A -> C	E -> D	Substitution	putative DNA repair and recombination protein,mitochondrial precursor
CP027809.1 /Chr 11	SNP /transition	489831	489831	1	T	C	T -> C	F -> L	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily A, member2
CP027809.1 /Chr 11	SNP /transversion	492334	492334	1	A	C	A -> C	N -> T	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily A, member2
CP027810.1 /Chr 12	SNP /transversion	388172	388172	1	G	C	G -> C	G -> A	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027810.1 /Chr 12	SNP /transition	388601	388601	1	T	C	T -> C	V -> A	Substitution	putative surface antigen protein 2

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027812.1 /Chr 14	SNP /transversion	483743	483743	1	G	C	G -> C	E -> D	Substitution	putative kinesin K39
CP027812.1 /Chr 14	SNP /transversion	483779	483779	1	A	C	A -> C	E -> D	Substitution	putative kinesin K39
CP027812.1 /Chr 14	SNP /transversion	483781	483781	1	G	C	G -> C	C -> S	Substitution	putative kinesin K39
CP027812.1 /Chr 14	SNP /transversion	492772	492772	1	G	C	G -> C	G -> A	Substitution	putative kinesin K39
CP027824.1 /Chr 25	SNP /transversion	21195	21195	1	A	C	A -> C	L -> R	Substitution	putative poly(A)-binding protein 3
CP027825.1 /Chr 26	Deletion	935189	935190	2	TT	C	TT -> C		Frame Shift*	putative peroxisomal membrane protein 4
CP027825.1 /Chr 26	SNP /transition	935192	935192	1	T	C	T -> C	F -> S	Substitution	putative peroxisomal membrane protein 4

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027825.1 /Chr 26	SNP /transition	935204	935204	1	T	C	T -> C	V -> A	Substitution	putative peroxisomal membrane protein 4
CP027825.1 /Chr 26	SNP /transition	935209	935209	1	T	C	T -> C	F -> L	Substitution	putative peroxisomal membrane protein 4
CP027825.1 /Chr 26	Insertion	935212	935212	1	-	C			Frame Shift*	putative peroxisomal membrane protein 4
CP027825.1 /Chr 26	SNP /transversion	935217	935217	1	G	C	G -> C	W -> C	Substitution	putative peroxisomal membrane protein 4
CP027825.1 /Chr 26	SNP /transition	935225	935225	1	T	C	T -> C	L -> P	Substitution	putative peroxisomal membrane protein 4
CP027826.1 Chr 27	SNP /transition	366789	366789	1	T	C	T -> C	V -> A	Substitution	putative phosphatidylinositol (3,5) kinase
CP027827.1 /Chr 28	SNP /transition	333494	333494	1	T	C	T -> C	V -> A	Substitution	putative ribonucleoside-diphosphate reductase large chain

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027827.1 /Chr 28	SNP /transition	771551	771551	1	T	C	T -> C	I -> V	Substitution	putative X-pro, dipeptidyl-peptidase,serine peptidase,Clan SC, family S15
CP027835.1 /Chr 35	SNP /transition	179333	179333	1	T	C	T -> C	V -> A	Substitution	putative proteophosphoglycan ppg3
CP027835.1 /Chr 35	SNP /transversion	183131	183131	1	G	C	G -> C	R -> P	Substitution	putative proteophosphoglycan ppg3
CP027835.1 /Chr 35	Insertion	184779	184779	1	-	C			Frame Shift*	putative proteophosphoglycan ppg3
CP027836.1 /Chr 36	SNP /transversion	52416	52416	1	G	C	G -> C	R -> G	Substitution	elongation factor 2
CP027836.1 /Chr 36	SNP /transversion	1755201	1755201	1	A	C	A -> C	H -> P	Substitution	related to elongation factor-2 kinase efk-1b isoform-like protein
CP027836.1 /Chr 36	SNP /transversion	2423355	2423355	1	G	C	G -> C	F -> L	Substitution	putative target of rapamycin (TOR) kinase 1

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027812.1 /Chr 14	Substitution	483755	483756	2	TG	CA	TG -> CA	AA -> AT	Substitution	putative kinesin K39
CP027836.1 /Chr 36	Substitution	52406	52407	2	GT	CA	GT -> CA	T -> C	Substitution	elongation factor 2
CP027810.1 /Chr 12	Substitution	388304	388310	7	AGGCTA C	CACAA CG	AGGCTAC - > CACAACG	KAT -> TQR	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027827.1 /Chr 28	Substitution	83223	83224	2	AA	CC	AA -> CC		Extension	putative propionyl-coa carboxylase beta chain
CP027836.1 /Chr 36	Substitution	52411	52413	2	AC	CGA	AGC -> CGA	A -> S	Substitution	elongation factor 2
CP027842.1 /Chr 9	Substitution	354734	354736	3	GAT	CGC	GAT -> CGC	I -> A	Substitution	polyubiquitin
CP027810.1 /Chr 12	Substitution	388357	388358	2	AC	CT	AC -> CT	T -> L	Substitution	putative surface antigen protein 2

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027825.1 /Chr 26	Substitution	935201	935202	2	TG	CT	TG -> CT	L -> P	Substitution	putative peroxisomal membrane protein 4
CP027808.1 /Chr 10	Substitution	162939	162941	3	GGT	CTA	GGT -> CTA	GC -> AS	Substitution	putative folate/biopterin transporter
CP027836.1 /Chr 36	Substitution	52398	52403	6	GACCGC	CTTATA	GACCGC -> CTTATA		Truncation*	elongation factor 2
CP027839.1 /Chr 6	SNP /transversion	35283	35283	1	C	G	C -> G	V -> L	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily G, member1
CP027839.1 /Chr 6	SNP /transition	35291	35291	1	A	G	A -> G	L -> P	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily G, member1
CP027839.1 /Chr 6	SNP /transition	35307	35307	1	A	G	A -> G	S -> P	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily G, member1
CP027829.1 /Chr 3	SNP /transversion	51650	51650	1	C	G	C -> G	N -> K	Substitution	putative delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027837.1 /Chr 4	SNP /transversion	377862	377862	1	C	G	C -> G	R -> P	Substitution	putative chloride channel protein
CP027808.1 /Chr 10	SNP /transition	162926	162926	1	A	G	A -> G	I -> V	Substitution	putative folate/biopterin transporter
CP027809.1 /Chr 11	SNP /transversion	513785	513785	1	T	G	T -> G	S -> A	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily A, member4
CP027809.1 /Chr 11	SNP /transversion	524336	524336	1	T	G	T -> G	V -> G	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily A, member5
CP027809.1 /Chr 11	SNP /transversion	527023	527023	1	T	G	T -> G	S -> A	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily A, member5
CP027810.1 /Chr 12	SNP /transversion	388075	388075	1	T	G	T -> G	S -> A	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027810.1 /Chr 12	SNP /transversion	388093	388093	1	T	G	T -> G	S -> A	Substitution	putative surface antigen protein 2

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027810.1 /Chr 12	SNP /transversion	388240	388240	1	C	G	C -> G	L -> V	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027810.1 /Chr 12	SNP /transversion	388290	388290	1	C	G	C -> G	D -> E	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027811.1 /Chr 13	SNP /transition	464402	464402	1	A	G	A -> G	V -> A	Substitution	putative endomembrane protein
CP027812.1 /Chr 14	SNP /transition	483751	483751	1	A	G	A -> G	K -> R	Substitution	putative kinesin K39
CP027820.1 /Chr 21	SNP /transition	110477	110477	1	A	G	A -> G	T -> A	Substitution	metallo-peptidase, Clan ME, Family M16
CP027821.1 /Chr 22	SNP /transversion	20253	20253	1	C	G	C -> G	C -> S	Substitution	mRNA cap methyltransferase-like protein
CP027825.1 /Chr 26	SNP /transition	43159	43159	1	A	G	A -> G	V -> A	Substitution	putative 60S ribosomal protein L7

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027826.1 Chr 27	SNP /transversion	1037529	1037529	1	T	G	T -> G	S -> A	Substitution	dynein heavy chain, point mutation
CP027832.1 /Chr 32	SNP /transition	1408265	1408265	1	A	G	A -> G	K -> R	Substitution	putative DEAD/DEAH box helicase
CP027835.1 /Chr 35	Insertion	184773	184773	1	-	G			Frame Shift*	putative proteophosphoglycan ppg3
CP027835.1 /Chr 35	SNP /transition	192194	192194	1	A	G	A -> G	T -> A	Substitution	proteophosphoglycan ppg4
CP027836.1 /Chr 36	SNP /transition	11811	11811	1	A	G	A -> G	F -> L	Substitution	putative PUF1
CP027836.1 /Chr 36	SNP /transversion	88202	88202	1	T	G	T -> G	Q -> H	Substitution	putative proteasome beta 2 subunit
CP027836.1 /Chr 36	SNP /transition	2381220	2381220	1	A	G	A -> G	I -> T	Substitution	putative flagellum transition zone component

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027827.1 /Chr 28	Substitution	83219	83221	2	AT	GAC	AAT -> GAC	N -> D	Substitution	putative propionyl-coa carboxylase beta chain
CP027812.1 /Chr 14	Substitution	292271	292274	3	CTG	GAGC	CATG -> GAGC	AM -> AL	Substitution	beta-ketoacyl-CoA synthase
CP027812.1 /Chr 14	Substitution	292288	292289	2	CA	GC	CA -> GC	AG -> AR	Substitution	beta-ketoacyl-CoA synthase
CP027826.1 Chr 27	Substitution	422551	422552	2	CA	GC	CA -> GC	M -> S	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily A, member9
CP027835.1 /Chr 35	Insertion	209925	209934	9	-----	GCCGG CTGC		-> AGC	Insertion*	proteophosphoglycan ppg4
CP027842.1 /Chr 9	Substitution	354749	354757	8	CGATCT CG	GGTCA GCGT	CGGATCTC G -> GGTCAGC GT	RDP -> TLT	Substitution	polyubiquitin
CP027842.1 /Chr 9	Substitution	354615	354616	2	CC	GT	CC -> GT	G -> T	Substitution	polyubiquitin

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027842.1 /Chr 9	Substitution	354623	354624	2	CA	GT	CA -> GT	L -> H	Substitution	polyubiquitin
CP027842.1 /Chr 9	Substitution	354741	354742	2	TC	GT	TC -> GT	E -> T	Substitution	polyubiquitin
CP027810.1 /Chr 12	Substitution	388361	388362	2	AG	GT	AG -> GT	E -> G	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027840.1 /Chr 7	Substitution	152963	152965	3	TGT	GTG	TGT -> GTG	DX -> AX	Substitution	putative protein kinase
CP027812.1 /Chr 14	Substitution	292278	292282	5	ACACT	GTGTA	ACACT -> GTGTA	SV -> YT	Substitution	beta-ketoacyl-CoA synthase
CP027840.1 /Chr 7	Insertion	152971	152971	1	-	T			Frame Shift*	putative protein kinase
CP027841.1 /Chr 8	SNP /transversion	291413	291413	1	A	T	A -> T	T -> S	Substitution	amastin-like protein

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027841.1 /Chr 8	SNP /transition	291416	291416	1	C	T	C -> T	P -> S	Substitution	amastin-like protein
CP027842.1 /Chr 9	SNP /transition	21375	21375	1	C	T	C -> T	A -> V	Substitution	putative RNA helicase
CP027842.1 /Chr 9	SNP /transition	537010	537010	1	C	T	C -> T	R -> H	Substitution	putative ubiquinone biosynthesis protein-like protein
CP027808.1 /Chr 10	SNP /transition	162915	162915	1	C	T	C -> T	P -> L	Substitution	putative folate/biopterin transporter
CP027808.1 /Chr 10	SNP /transversion	162920	162920	1	G	T	G -> T	V -> F	Substitution	putative folate/biopterin transporter
CP027808.1 /Chr 10	SNP /transversion	163006	163006	1	G	T	G -> T	M -> I	Substitution	putative folate/biopterin transporter
CP027808.1 /Chr 10	SNP /transition	163049	163049	1	C	T	C -> T	P -> S	Substitution	putative folate/biopterin transporter

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027809.1 /Chr 11	SNP /transition	492330	492330	1	C	T	C -> T	P -> S	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily A, member2
CP027812.1 /Chr 14	Insertion	292286	292286	1	-	T			Frame Shift*	beta-ketoacyl-CoA synthase
CP027812.1 /Chr 14	SNP /transition	483721	483721	1	C	T	C -> T	T -> M	Substitution	putative kinesin K39
CP027813.1 /Chr 15	SNP /transversion	467057	467057	1	G	T	G -> T	T -> N	Substitution	putative protein kinase
CP027813.1 /Chr 15	SNP /transition	530307	530307	1	C	T	C -> T	S -> N	Substitution	MGT1 magnesium transporter
CP027823.1 /Chr 24	SNP /transition	553614	553614	1	C	T	C -> T	A -> V	Substitution	multi drug resistance protein-like
CP027825.1 /Chr 26	Insertion	7870	7870	1	-	T			Frame Shift*	putative putative glycine dehydrogenase

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027826.1 Chr 27	SNP /transversion	206348	206348	1	G	T	G -> T		Truncation*	putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2
CP027826.1 Chr 27	SNP /transition	422559	422559	1	C	T	C -> T	V -> M	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily A, member9
CP027826.1 Chr 27	SNP /transition	587724	587724	1	C	T	C -> T	A -> V	Substitution	choline kinase
CP027836.1 /Chr 36	Insertion	52410	52410	1	-	T			Frame Shift*	elongation factor 2
CP027842.1 /Chr 9	Substitution	354729	354730	2	GG	TC	GG -> TC	P -> E	Substitution	polyubiquitin
CP027810.1 /Chr 12	Substitution	388300	388301	2	AA	TC	AA -> TC	K -> S	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027834.1 /Chr 34	Insertion	121924	121925	1	G-	TC	G -> TC		Frame Shift*	deoxyhypusine synthase

Çizelge 3.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Saptanan Polimorfizmlerin Fonksiyonu Bilinen Proteinler Üzerine Etkisi.

Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizm Tipi	Minimum	Maksimum	Uzunluk (bp)	Referans Dizi	Varyant Dizi	Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	Ürün
CP027840.1 /Chr 7	Substitution	152940	152946	6	CTCTTT	TCCTCC A	CCTCTTT - > TCCTCCA	GKR -> GGG	Substitution	putative protein kinase
CP027810.1 /Chr 12	Substitution	388167	388168	2	GC	TG	GC -> TG	SL -> SV	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027842.1 /Chr 9	Substitution	354618	354620	3	CCG	TGA	CCG -> TGA	RG -> RH	Substitution	polyubiquitin
CP027810.1 /Chr 12	Substitution	388175	388176	2	CG	TT	CG -> TT	T -> I	Substitution	putative surface antigen protein 2
CP027826.1 Chr 27	Substitution	422554	422556	2	CC	TTG	CTC -> TTG	E -> Q	Substitution	ATP-binding cassette protein subfamily A, member9

*Lin_TR01 genomunda saptanan ve proteine etkisi bakımından önemli olabilecek polimorfizmler.

4. TARTIŞMA

Dünden bugüne *Leishmania* tüm genom dizileme çalışmaları incelenecek olursa, *Leishmania* tüm genomu dizisinin ilk kez çıkarılmasından bu yana yaklaşık 10 yıllık bir zaman geçtiği görülecektir. Bu süreç oldukça kısa gibi görünse de tüm genom dizileme çalışmalarının hızlı bir şekilde artışı ve yaygınlaşması göz önünde bulundurulursa, *Leishmania* türleri üzerinde yapılan tüm genom dizileme çalışmalarının oldukça sınırlı olduğu anlaşılacaktır. Zira günümüzde halen sadece birkaç *Leishmania* türünün yüksek kalite ve tamamlanmış genomu bulunmaktadır (Leprohon ve ark., 2015). Bunlar (i) VL için, *L. infantum* JPCM5 (Peacock ve ark., 2007) ve *L. donovani* BPK282/0cl4 (Downing ve ark., 2011), (ii) CL için, *L. major* Friedlin (Ivens ve ark., 2005), *L. mexicana* U1103 (Rogers ve ark., 2011), (iii) MCL için, *L. braziliensis* M2904 (Peacock ve ark., 2007), (iv) *L. tarentolae* (Raymond ve ark., 2012) ve (v) *L. amazonensis* (Real ve ark., 2013) şeklindedir. Diğer parsiyel *Leishmania* genom dizilerine TriTrypDB (www.tritrypdb.org) adresinden ulaşılabilir.

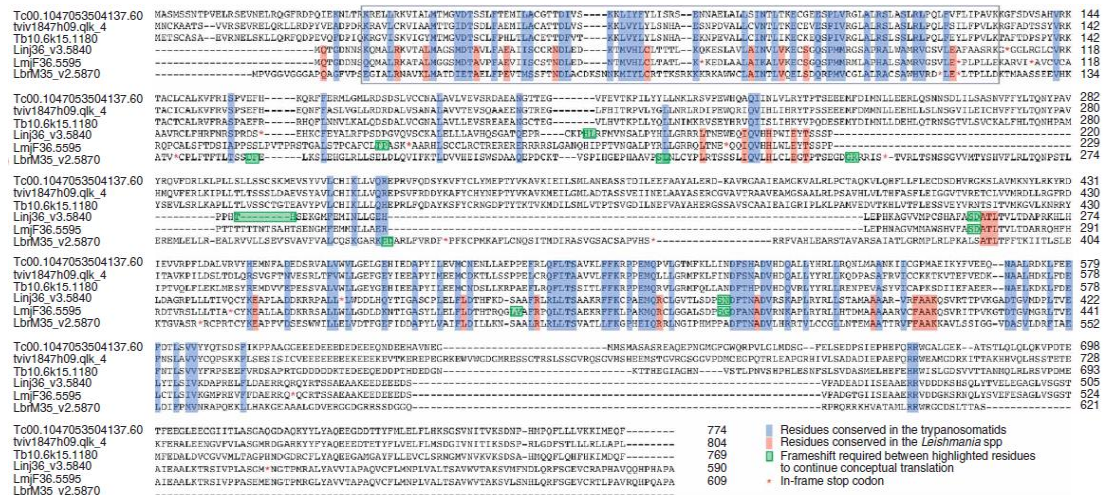
Cantacessi ve ark. (2015), yaptıkları bir derlemede *Leishmania* türleri üzerinde yapılan tüm genom dizileme çalışmalarını değerlendirerek genomik ve transkriptomik analizler, *Leishmania* 'nın biyolojisi ve parazit-konak-vektör üçgeni arasında meydana gelen karmaşık etkileşimleri daha iyi anlamamız için bizlere ışık tutacağını söylemişlerdir.

İlk kez bir *Leishmania* türünün (*L. major*) Ivens ve ark. (2005), tarafından tüm genom dizisi çıkarılmıştır. Bu çalışma İngiltere *Wellcome Trust Sanger Enstitüsü* (WTSI) ve Amerika *Seattle Biomedical Research Institute* iş birliği ile yapılmış olup, sekans işleminde *Shotgun Dizileme metodu*[†] kullanılmıştır. Bu çalışmada *Leishmania*

[†]: Shotgun Dizileme metodu uzun DNA parçalarını dizilemek için kullanılır. Bu metodta büyük boyutlardaki genomik DNA veya bakteri yapay kromozomları fiziksel olarak rastgele küçük (300-800 bp) boyutlara parçalanır. Bu DNA parçacıkları, uçlarına eklenen adaptörlerden DNA yakalama boncukları tarafından tutularak bir DNA kütüphanesi oluşturulur. Daha sonra her bir boncuk tarafından yakalanan DNA parçacığı ayrı ayrı dizilenir ve okunan bütün parçalar Biyoinformatik yazılımlarla birleştirilir.

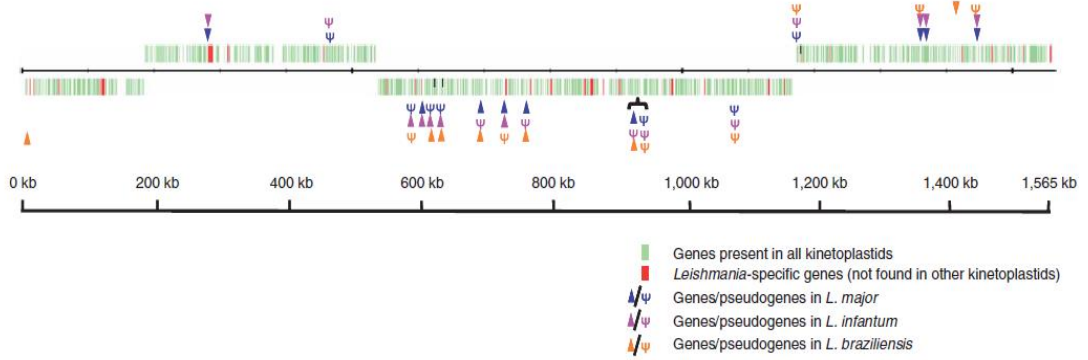
major (Friedlin suşu, referans genom) sekanslanmış ve 36 kromozom üzerinde 32,8-megabase haploid genom, 911 RNA geni, 39 psödogen ve 8272 protein-kodlayan gen gösterilmiştir. Bu genler arasında konak-patojen etkileşimlerinin düzenlenmesinde rol oynayan proteolitik enzimler ve kompleks yüzey glikokonjugatlarının sentezi gibi fonksiyonlardan sorumlu genler yer almaktadır (Ivens ve ark., 2005).

2007 yılında *L. infantum* ve *L. braziliensis* türlerinin de genom dizileri WTSI liderliğinde çok merkezli bir çalışmada ile tamamlanmıştır (Peacock ve ark., 2007). Bu iki türün tüm genom sekanslarını dizilerken araştırmacılar yaklaşık altı katı *coverage* elde etmek için, değişken uzunlukta (4 kb'a kadar) genom fragmentlerini ihtiva eden plazmid klonları ile shotgun dizilemesi kullanmışlardır. Peacock ve ark. (2007), bu çalışmada her iki türün tüm genomunu *L. major* ile karşılaştırmış ve genomlarının büyük ölçüde korunmuş olduğunu (Şekil 4.1) sadece 200 kadar genin her üç türde farklılık gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Psödogen formasyonları ve gen kaybı farklı genomları şekillendiren ana unsurlardır. Türler arasındaki farklı ve protein kodlayan genler konak-parazit interaksyonu ve makrofaj içerisindeki parazitini yaşamını devam ettirmesi açısından önemlidir.



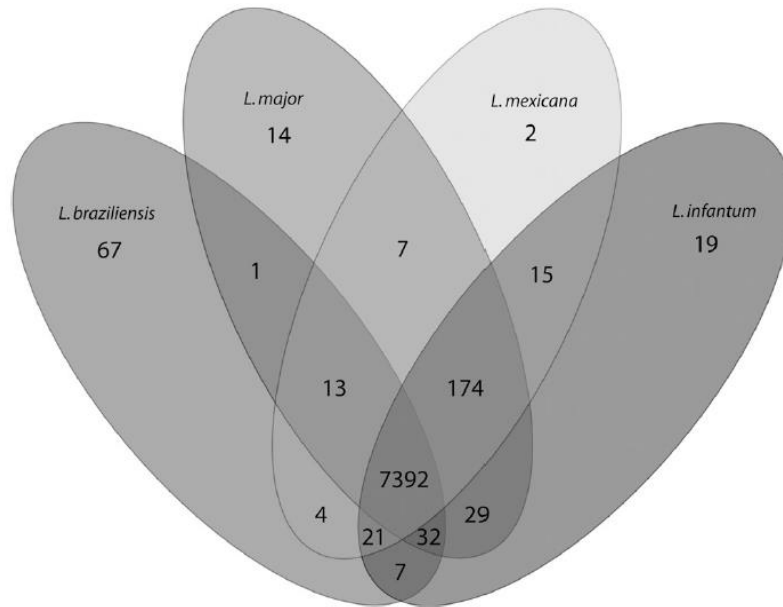
Şekil 4.1. *Leishmania* türlerinde korunmuş psödogenler. Üç *Leishmania* türü ve bunların *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* ve *T. vivax*'daki ortolog proteinlerinin amino asit aligment dizileri, görüldüğü üzere tüm bu türlerde domainlerin korunmuştur. N-terminal β -adaptin zinciri (kutu içindeki bölge) altı tür arasındaki korunmuşluğu göstermektedir (Peacock ve ark., 2007).

Bu çalışmada, her üç türde sadece 23 psödogen saptanmıştır. Peacock ve ark. (2007) göre, küçük dejenarasyonlar psödogen oluşumuna veya pozitif seleksiyonuna yol açmaktadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *Leishmania* türlerinde psödogenler. Kromozom 32'nin üç *Leishmania* türü arasındaki farklılaşması şematik olarak gösterilmektedir. Çoğu gen farklılaşması, insersiyon ve delesyondan ziyade psödogen formasyonu ile meydana gelmektedir (Peacock ve ark., 2007).

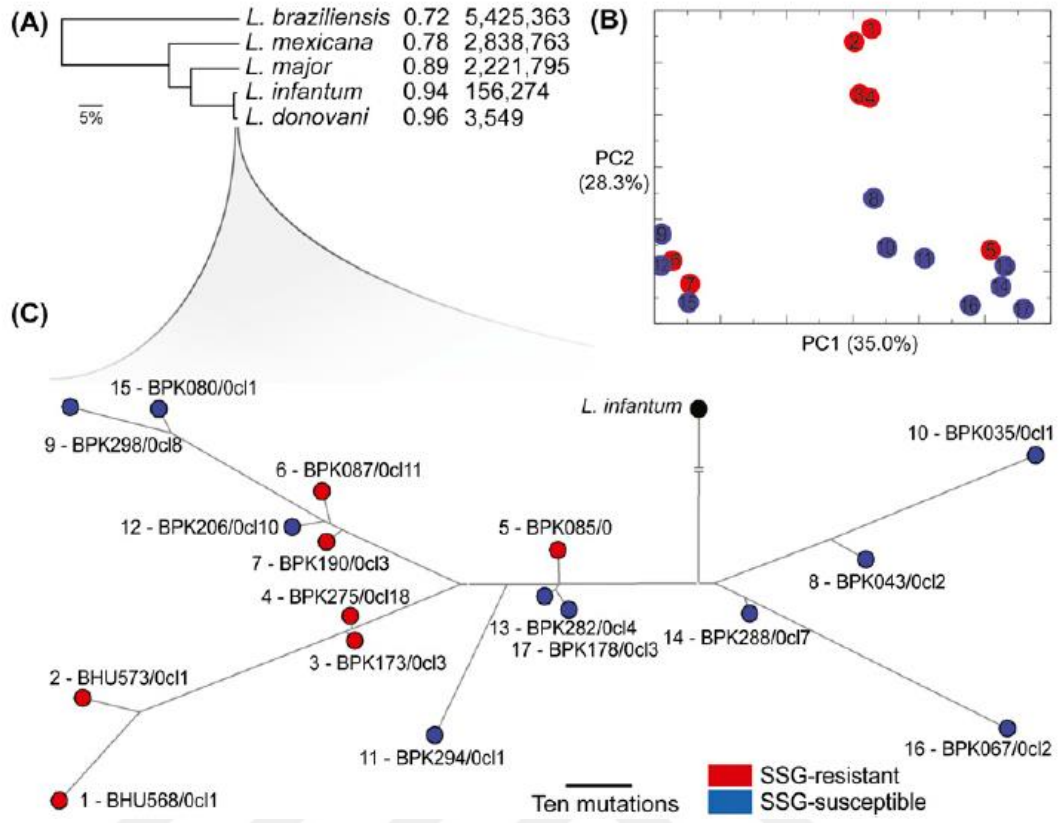
Dört yıl sonra aynı teknikle *L. mexicana*'nin tüm genom sekansı çıkarılmıştır (Rogers ve ark., 2011). Rogers ve ark. (2011), *L. mexicana* referans genomunu diğer *L. major*, *L. infantum* ve *L. braziliensis* ile karşılaştırdıklarında türe özgü çok az sayıda gen veya paralog grup (sırasıyla 2, 14, 19, ve 67) taşıdıklarını göstermişlerdir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Venn diagramı. *L. mexicana* U1103, *L. major* Friedlin, *L. infantum* JPCM5 ve *L. braziliensis* M2904'de korunmuş bölgeler ve paralog gruplar (Rogers ve ark., 2011).

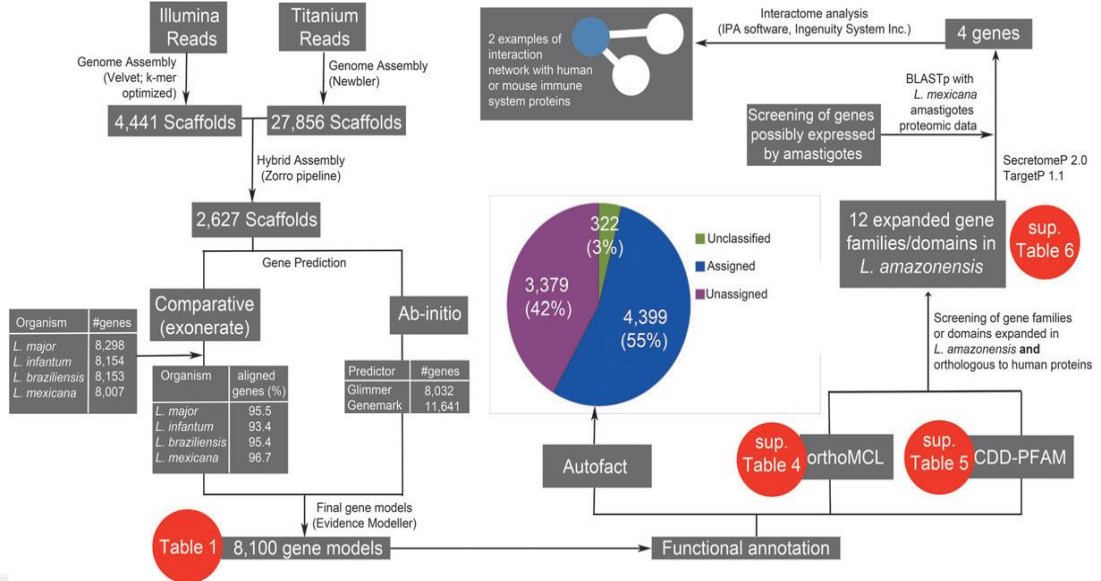
Yine 2011’de, ilk kez “Yeni nesil DNA dizileme”[‡] teknolojisi ile *L. donovani* referans genomunun dizisi tamamlanmıştır (Downing ve ark., 2011). Downing ve ark. (2011), bir pirosekans dizileme sistemi (454 Roche) kullanarak total 1,29 milyon *single end* ve 3,58 milyon *paired end* okuma (ortalama 167 baz bp uzunlukta) gerçekleştirmiş ve bu şekilde referans dizi %96 oranında oluşturulmuştur. Daha sonra Nepal ve Hindistan’da VL hastalarından elde edilen 17 klinik izolat (referans genom dahil) *Illumina Sequencing* ile sekanslanmıştır ve total olarak 41 Gb sekans verisi oluşturulmuştur. Ardından her bir izolattan elde edilen 76 bp’lik *paired end* okuma referans genom ile eşleştirilmiş ve *Leishmania* popülasyon genetiği ve ilaç direncine neden olan mekanizmaları anlamak için SNP (single nucleotide polymorphism) analizi yapılmıştır (Şekil 4.4).

[‡] Yeni nesil dizileme; genom, transkriptom, DNA-protein etkileşimlerinin geniş kapsamlı analizini ucuz, rutin ve yaygın hale dönüştürdüğünden biyolojik araştırmaları önemli ölçüde hızlandırma potansiyeline sahiptir. Yeni nesil dizileme teknolojisi; mRNA, küçük RNA profili, transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerinin genom boyu karakterizasyonu, kromatin yapısı ve metilasyon paterni, atasal DNA mikrobiyolojisi ve metagenomik için yeni ve hızlı yollar sağlar. Günümüzde kullanılan yeni nesil dizileme sistemleri, Roche 454 genome analyzer, Illumina Genome Analyzer, Applied BioSystem SOLiD, Complete Genomics, Helios, Pacific Biosciences ve IonTorrent’dir.



Şekil 4.4. *Leishmania donovani* izolatlarında fonksiyonel varyasyonların filogenetik analizi. (A) *Leishmania* türlerinin filogenetik ağacı. Kısmi benzerlik (108,000 mutasyon, %1'e eşdeğerdir) gösterilmektedir. İlk sütunda bilinen genomlar *L. donovani* ortolog genomları ile align edilmiştir, ikinci sütunda ise saptanan SNP sayıları gösterilmektedir. (B) Temel bileşen analizi (Principle component analysis =PCA). 17 *L. donovani* izolatının SNP analizine göre SGG (Sodium stibogluconate) paterni, dirençli (kırmızı daire) ve duyarlı (mavi daire) renklerle gösterilmiştir. Üç ana grup total varyasyonun %63,3'ünü içeren iki önemli PC'ye ayrılmıştır. (C) 17 izolatın filogenetik gösterimi. BHU ile başlayan suşlar Hindistan, BPK ile başlayanlar ise Nepal'den izole edilmiştir. Dalların uzunluğu kökenler arasındaki farklılıkların düzeyi ile doğru orantılıdır. *L. infantum* (siyah) atasal kökü göstermekte olup, kısaltılmıştır (Downing ve ark., 2011).

En son *Leishmania* genom dizisi (*L. amazonensis*), Roche 454 ve Illumina sekanslama sisteminin birlikte kullanılarak elde edilmiştir (Real ve ark., 2013). Roche 454 ile yapılan çalışmada 179 000 454 sekans, 27 856 kontig (=contig, çakışan DNA fragmanları serisi) 4411 scaffold (kontiglerin birleştirilmesi ile elde edilen dizi) elde edilmiştir. Diğer yandan yaklaşık olarak 37 milyon 76-bp çift yönlü Illumina dizisi 2627 scaffold şeklinde derlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Bu çalışmada kullanılan biyoinformatik analiz iş akış şeması. *L. amazonensis* genomunun sekans okumalarını içeren 2627 scaffold ile 8100 gen *Competative* ve *Ab-initio* yazılımları ile tahmin edilmiştir. Varsayılan genlerin fonksiyonel analizi: (i) AutoFACT ile genlerin %45'inin fonksiyonu sınıflandırılmamış veya anlaşılammıştır; (ii) *Leishmania* spp. arasındaki ortolog gen ailelerinin taranması (OrthoMCL); (iii) CDD ile PFAM veritabanlarında korunmuş protein alanları ile ilgili bilgi için tarama. Genişletilmiş veya özel ortolog proteinler ya da *L. amazonensis* genomunda korunmuş bölgeler memeli konak proteinler ile interaktom analiz için seçilmiştir. Bu ise tahmini olarak salgılanan proteinleri (SecretomeP ve TargetP kullanılarak) saptamaya ve dahası insan ve farelerde immün fonksiyon ile ilişkili ortolog proteinleri saptamaya yönelik bir seçimdir (Real ve ark., 2013).

Leprohon ve ark. (2015), tarafından yapılan bir derlemede *Leishmania* ilaç direnci ve bunun yeni yönlerini anlamımıza ışık tutacak tüm genom sekansında çalışmalarında geline son gene noktalar özetlenmiştir. Bununla birlikte günümüze değin yapılan *Leishmania* tüm genom çalışmaları sonucunda elde edilen bilgileri sistematik olarak özetlemesi açısından bu noktayı tartışırken bize yol gösterici olmuştur.

Leishmania infantum, *L. donovani*, *L. major* ve *L. tarentolae* 36 kromozomdan oluşurken, *L. braziliensis*'de 20 ve 34'üncü kromozomlarının füzyon ile birleşmesine bağlı olarak 35 kromozomdan bulunmaktadır (Britto ve ark., 1998; Peacock ve ark., 2007). *Leishmania mexicana* ise 34 kromozomdan oluşmaktadır, zira 8 ile 29 ve 20 ile 36'ıncı kromozomları füzyon ile birleşmişlerdir (Britto ve ark., 1998; Rogers ve ark., 2011).

Tahmini olarak 20-100 milyon yıl önce *L. Viannia* spp. ve *L. Leishmania* spp. türleri ayrılmış olmasına rağmen, genomik yapı türler arasında yüksek derecede *synteny* (aynı kromozom üzerindeki bir genetik lokusun fiziksel olarak ko-

lokalisasyonunu) ile karakterizedir (Peacock ve ark., 2007). Karşılaştırmalı genomik ile de son derece az sayıda türe özgü gen ortaya çıkarılmıştır. *Leishmania infantum*, *L. major* veya *L. mexicana*'da türe spesifik yirmiden az gen veya paralog grup bulunmaktadır (Britto ve ark., 1998; Rogers ve ark., 2011). Paralog grupların sayısı nispeten *L. braziliensis* (67 gen) ve *L. tarentolae* (95 gen) türlerinde, sırasıyla *Viannia* subgenus ve *SauroLeishmania* subgenusunda yer almaları ile uyumlu olarak biraz daha fazladır. Dahası, *L. tarentolae* patojen türlerin hücre içi yaşam evresi ile ilişkili genler bulunmamaktadır (Raymond ve ark., 2012). *Leishmania brazillensis*'in, *Leishmania* subgenus *Leishmania* türlerinde bulunan fonksiyonel RNA interferans ve transpozon elementleri gibi özellikleri taşımadığı gösterilmiştir (Lye ve ark., 2010; Peacock ve ark., 2007). **Bu türe özgü genlerin çok az olması, hastalık tropizmi ve türler arasında ilaç duyarlılığındaki varyasyonların gen ekspresyonu ve ortak bir çekirdek genin ifadesindeki dozaj farklılıkları ile ortaya çıktığını akla getirmektedir** (Sanchez-Canete ve ark., 2009; Yardley ve ark., 2005).

Bizim çalışmamızda da *L. infantum*'un 32.009.138 baz çifti büyüklüğünde tüm genom dizisi çıkarılmış, Lin_TR01 ile referans genom arasında 3153 adet polimorfik bölge saptanmıştır. Başka bir deyişle referans genom ile yaklaşık 0,01 oranında farklılık saptanmış ve genomik DNA'nın büyük ölçüde korunduğu görülmüştür.

Leishmania parazitlerinin gen ekspresyonunun kendine özgü bir mekanizmasına bulunmaktadır. Protein kodlayan genler aynı DNA sarmalı üzerindeki bitişik birimlerin parçası olarak kromozomlar üzerinde dağılmışlardır. RNA polimeraz II tarafından polisistronik transkripsiyon birimleri gibi ko-transkripsiyona uğrarlar (Haile ve Papadopoulou, 2007). Transkripsiyonel kontrol olmaksızın çevresel strese adapte olmak için (ilaç etkisi de dahil olmak üzere) *Leishmania* mRNA düzeylerini değiştirmek için, gen amplifikasyonu ile gen dozajının artırılması, dublikasyon, delesyon ve anöploidi gibi mekanizmalar geliştirdi (Leprohon ve ark., 2009; Ubeda ve ark., 2008). Bunun aksine ilaç hedefleri, transporter veya anahtar enzimler gen ekspresyonunun değişmesine gerek duymaksızın iyi bir şekilde adaptasyon göstermektedirler (Ritt ve ark., 2013).

Son yıllarda NGS teknolojisi ile *Leishmania* ilaç direnci biyomarker ve determinantlarının identifikasyonu çalışmaları artarak devam etmektedir. Dirençli *Leishmania* suşlarında gen ekspresyonundaki modülasyonun belirlenmesini, gen ifadesindeki dozaj değişikliklerini, kromozom kopya sayısındaki değişimleri, SNP'leri saptamaya olanak sağlamıştır. Popülasyon içerisindeki klonların da genellikle hem genotip hem de fenotiplerinin farklı olduğu, popülasyon düzeyinde etkileyici bir heterojenitenin olduğu gözlenmiş, bu nedenle direnç mekanizmalarının aydınlatılması zorlaşmıştır (Leprohon ve ark., 2015).

Özetle *Leishmania* genomu ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda; (i) Genetik çeşitliliğin ileri düzeyde olduğu görülmüş, taksonomisi güncellenmiştir. (ii) Atasal DNA araştırmaları türlerin tarihsel ayrışmasını ortaya koymuştur. (iii) *Leishmania* türlerinin biyolojisi ve parazit-konak-vektör üçgeni daha iyi anlaşılmıştır. (iv) *Leishmania* türlerinin doku tropizminde ortaya çıkan farklılıkların nedenlerinin anlaşılabilirliği düşünülmektedir. (v) NGS teknolojisi ilaç direnci biyomarker ve determinantlarının identifikasyonuna imkan vermektedir.

Tüm bu genom çalışmaları esasen bize *Leishmania* konusunda önümüzde katedilecek daha çok yol olduğunu göstermektedir. Biz de yaptığımız çalışma ile bu konuda bilime katkı sağladığımız, elde edilen verilerin ülkemizde yapılacak *Leishmania* genom çalışmaları için bir temel oluşturacağı ve global düzlemdeki çalışmalara katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

Bu çalışmada ülkemizde ilk defa kutanöz leishmaniosis olgusundan izole edilen *Leishmania infantum*'un tüm genom dizisi çıkarılmış ve ardından elde edilen genomik DNA, NCBI GenBank'a (www.ncbi.nlm.nih.gov) yüklenerek ***Leishmania infantum*_TR01 (Lin_TR01)** ismi ile kaydedilmiştir (NCBI, 2018a). Bu konuda yapılan WGS çalışmaları incelendiğinde, Lin_TR01 suşu kutanöz leishmaniosis olgusundan izole edilmiş olması açısından bir ilktir. Zira referans genom olan *L. infantum* JPCM5 (Peacock ve ark., 2007) suşu türün klasik doku ve organ tropizmine uygun olarak visseral leishmaniosis olgusundan elde edilmiştir. Diğer yandan Lin_TR01, JPCM5 suşundan bu yana dünya genelinde tüm genomu dizilenen ikinci

suş olma niteliğindedir. Lin_TR01 genomu elde edilen diğer genomlar ile karşılaştırıldığında seviye olarak *complete* durumda olan tek *Leishmania infantum* tüm genom dizisidir (NCBI, 2018c).

Çalışmamızda elde ettiğimiz genomik DNA referans suş ile karşılaştırıldığında saptanan polimorfizmler içerisinde **166 adet fonksiyonu bilinen protein üretimini kodlayan bölge polimorfizmleri** bulgular bölümü Çizelge 3.1’de detaylı olarak gösterilmiştir. Burada yer alan polimorfizmler protein üzerine etkisi bakımından “*substitution, frame shift, truncation, insertion* ve *extention*” şeklindedir. Esasen polimorfizmin protein üzerindeki etkisinin doğrulanması için protein ekspresyonu gibi ilave deneylere ihtiyaç vardır. Ancak yine de mutasyonun tipine göre de etki olasılığı hakkında fikir sahibi olmak mümkündür. Burada bahsi geçen *substitution* ve *extention* tipi mutasyonlar protein üzerinde fonksiyonel değişiklik veya üretimin durması gibi değişikliklere yol açabileceği gibi açmayadabilir de, ancak bunların arasında yer alan 26 adet “*frame shift, truncation* ve *insertion*” tipi polimorfizmin çok yüksek olasılıkla proteinin yapısını bozabileceği veya üretimini durdurabileceğini söylemek mümkündür.

Buradan hareketle 26 adet yüksek olasılıklı mutasyon saptanan protein başta olmak üzere polimorfizm saptadığımız proteinler ile ilgili günümüze değin yapılmış çalışma olup-olmadığı, varsa eldeki bilgilerin neler olduğu konusu detaylı olarak araştırılmıştır. **Mutasyon saptadığımız fonksiyonel proteinler ile ilgili günümüze değin yapılan çalışmalar hakkında literatür taraması** yapılarak sonuçları Çizelge 4.1’de özetlenmiş ve aşağıda tartışılmıştır. PubMed veritabanı taranarak yapılan çalışma 26.10.2018 tarihine kadar yayımlanmış olan literatürü kapsamaktadır.

Çizelge 4.1. Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
amastin-like protein (n=6)	CP027841.1 /Chr 8	291420	1	SNP /transition	G -> D	Substitution	Azizi H ve ark., 2009	Virülans ile ilişkili protein	Virülans
		291422	2	Substitution	V -> T	Substitution			
		291403	1	SNP /transversion	K -> N	Substitution			
		291470	1	SNP /transversion	E -> Q	Substitution			
		291413	1	SNP /transversion	T -> S	Substitution			
		291416	1	SNP /transition	P -> S	Substitution			
ATP-binding cassette protein subfamily A, member2 (n=4)	CP027809.1 /Chr 11	489877	1	SNP /transition	G -> D	Substitution	Bulunamadı		
		489831	1	SNP /transition	F -> L	Substitution			
		492334	1	SNP /transversion	N -> T	Substitution			

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
		492330	1	SNP /transition	P -> S	Substitution			
ATP-binding cassette protein subfamily A, member4 (n=1)	CP027809.1 /Chr 11	513785	1	SNP /transversion	S -> A	Substitution	Bulunamadı		
ATP-binding cassette protein subfamily A, member5 (n=2)	CP027809.1 /Chr 11	524336	1	SNP /transversion	V -> G	Substitution	Bulunamadı		
		527023	1	SNP /transversion	S -> A	Substitution			
ATP-binding cassette protein subfamily A, member9 (n=3)	CP027826.1 Chr 27	422551	2	Substitution	M -> S	Substitution	Bulunamadı		
		422559	1	SNP /transition	V -> M	Substitution			
		422554	2	Substitution	E -> Q	Substitution			
ATP-binding cassette protein subfamily C, member6 (n=1)	CP027831.1 /Chr 31	519270	1	SNP /transition	T -> I	Substitution	Zhang ve Matlashewski, 2012	Delesyonunun hipervirülansa yol açtığı gösterilmiş	Virülans
	CP027839.1 /Chr 6	35293	1	SNP /transversion	M -> I	Substitution	Bulunamadı		

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
ATP-binding cassette protein subfamily G, member1 (n=7)		35300	4	Substitution	VS -> LI	Substitution			
		35286	1	SNP /transversion	S -> A	Substitution			
		35296	1	SNP /transversion	F -> L	Substitution			
		35283	1	SNP /transversion	V -> L	Substitution			
		35291	1	SNP /transition	L -> P	Substitution			
		35307	1	SNP /transition	S -> P	Substitution			
beta-ketoacyl-CoA synthase (n=5)	CP027812.1 /Chr 14	292294	1	Deletion		Frame Shift*	Bulunamadı		
		292271	3	Substitution	AM -> AL	Substitution			
		292288	2	Substitution	AG -> AR	Substitution			
		292278	5	Substitution	SV -> YT	Substitution			
		292286	1	Insertion		Frame Shift*			

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
chaperone protein-like protein (n=1)	CP027825.1 /Chr 26	254465	1	SNP /transition		Truncation*	da Fonseca Pires ve ark., 2014	Virülans ile ilişkili protein, parazitin sağkalımını artırdığı gösterilmiş	Virülans
choline kinase (n=1)	CP027826.1 Chr 27	587724	1	SNP /transition	A -> V	Substitution	Pulido ve ark., 2017	Hücre zarı sentezinde görevli bir enzim, inhibe edilerek yeni leishmanisidal ilaçlar için hedef bölge olabileceği gösterilmiş	İlaç hedefi
deoxyhypusine synthase (n=3)	CP027834.1 /Chr 34	121911	1	SNP /transversion	P -> T	Substitution	Bulunamadı		
		121926	1	SNP /transversion	R -> S	Substitution			
		121924	1	Insertion		Frame Shift*			

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
dynein heavy chain, point mutation (n=1)	CP027826.1 Chr 27	1037529	1	SNP /transversion	S -> A	Substitution	1) Dea-Ayuela ve ark., 2008; 2) Adhiambo ve ark., 2005	1) Leishmanisidal ilaçlar için yeni hedef bölge olabileceği düşünülmüş.1;2) Dyneinler siliya ve flagella hareketi, nükleer göç, mitotik splinin organizasyonu ve mitoz sırasında kromozom ayrılması gibi temel süreçleri yöneten önemli proteinlerdir.	İlaç hedefi
elongation factor 2 (n=5)	CP027836.1 /Chr 36	52416	1	SNP /transversion	R -> G	Substitution	1) Agallou ve ark., 2018; 2) Moreira ve Murta, 2016	1) İmmünojenik, aşı adayı protein; 2) Leishmanisidal direnç mekanizmasında rolü gösterilmiş	1-Aşı adayı 2- ilaç direnci
		52406	2	Substitution	T -> C	Substitution			
		52411	2	Substitution	A -> S	Substitution			
		52398	6	Substitution		Truncation*			
		52410	1	Insertion		Frame Shift*			

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
glucose-6-phosphate isomerase (n=1)	CP027810.1 /Chr 12	300315	1	SNP /transition	V -> I	Substitution	1) Coleman ve ark., 2009; 2) Mauricio ve ark., 2006; 3) Wortmann ve ark., 2005; 4) Pesson ve ark., 2004; 5) Awadalla ve ark., 1987	1;3) Leishmaniosisin real-time PCR ile tanısında kullanılmaktadır. 2;4;5) Leishmania donovani kompleks MON (Multilokus enzim elektroforezi) tiplendirmesinde kullanılan enzimlerden biridir.	Tanı ve tiplendirme
glutaredoxin-like protein (n=1)	CP027807.1 /Chr 1	29110	1	SNP /transversion	Q -> H	Substitution	Bulunamadı		
GP63, leishmanolysin (n=1)	CP027808.1 /Chr 10	223677	1	SNP /transversion	F -> Y	Substitution	1) Sinha ve ark., 2011; 2) Contreras ve ark., 2010; 3) Ivens ve ark., 2005	1) VL'de aşı adayı protein; 2) Virülansla ilişkili yüzey proteazı, konak makrofajı AP-1 aktivitesini azaltarak virülansla rol oynadığı gösterilmiş; 3) Konak hücre sine girişte rol oynar.	1-Aşı adayı 2-Virülansla ilişkili

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
MAP kinase-like protein (n=1)	CP027835.1 /Chr 35	1581464	1	SNP /transition	E -> K	Substitution	Bulunamadı		
metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3 (n=1)	CP027807.1 /Chr 1	264371	1	Deletion		Frame Shift*	1) Lima ve ark., 2017; 2) da Fonseca Pires ve ark., 2014	1) CL serolojisinde aday protein; 2) Virülans ile ilişkili, metallopeptidaz konak hücrenin koruyucu protein ve peptitlerinin yıkımı ile ilişkili bulunmuş	Tanı
metallo-peptidase, Clan ME, Family M16 (n=1)	CP027820.1 /Chr 21	110477	1	SNP /transition	T -> A	Substitution	Bulunamadı		
MGT1 magnesium transporter (n=1)	CP027813.1 /Chr 15	530307	1	SNP /transition	S -> N	Substitution	Bulunamadı		
mRNA cap methyltransferase-like protein (n=1)	CP027821.1 /Chr 22	20253	1	SNP /transversion	C -> S	Substitution	Bulunamadı		
multi drug resistance protein-like (n=1)	CP027823.1 /Chr 24	553614	1	SNP /transition	A -> V	Substitution	Bulunamadı		

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
polyubiquitin (n=10)	CP027842.1 /Chr 9	354732	1	SNP /transition	P -> L	Substitution	Oliveira ve ark., 2011	VL serolojisinde kullanılabileceği düşünülmüş, ancak tek başına serodiagnosis için yeterli bulunmamıştır.	1-Tanı 2-Virülans
		354738	2	Substitution	G -> I	Substitution			
		354747	1	SNP /transition	D -> G	Substitution			
		354734	3	Substitution	I -> A	Substitution			
		354749	8	Substitution	RDP -> TLT	Substitution			
		354615	2	Substitution	G -> T	Substitution			
		354623	2	Substitution	L -> H	Substitution			
		354741	2	Substitution	E -> T	Substitution			
		354729	2	Substitution	P -> E	Substitution			
		354618	3	Substitution	RG -> RH	Substitution			

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
protein kinase-like protein (n=1)	CP027835.1 /Chr 35	743411	1	SNP /transition	R -> K	Substitution	Bulunamadı		
proteophosphoglycan ppg4 (n=3)	CP027835.1 /Chr 35	207192	1	SNP /transition	G -> S	Substitution	Bulunamadı		
		192194	1	SNP /transition	T -> A	Substitution			
		209925	9	Insertion	-> AGC	Insertion*			
putative 60S acidic ribosomal protein P2 (n=8)	CP027829.1 /Chr 3	143240	1	Deletion /tandem repeat		Frame Shift*	Bulunamadı		
		143258	1	Deletion		Frame Shift*			
		143339	1	Deletion /tandem repeat		Frame Shift*			
		143391	1	Deletion		Frame Shift*			
		143400	1	Deletion /tandem repeat		Frame Shift*			
		143416	1	Deletion		Frame Shift*			

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
		143389	1	SNP /transition	G -> D	Substitution			
		143380	2	Substitution	G -> E	Substitution			
putative 60S ribosomal protein L7 (n=1)	CP027825.1 /Chr 26	43159	1	SNP /transition	V -> A	Substitution	Bulunamadı		
putative ADP-ribosylation factor GTPase activating protein (n=1)	CP027836.1 /Chr 36	1253290	1	SNP /transition	A -> V	Substitution	Bulunamadı		
putative amino acid transporter (n=1)	CP027826.1 Chr 27	644540	1	SNP /transition	V -> M	Substitution	Geraldo ve ark., 2005	Konakçıda bulunan amastigot formunda amino asit tutulumundan sorumlu bir protein olarak tanımlanmıştır.	Yaşamsal fonksiyon
putative beta-fructofuranosidase (n=1)	CP027837.1 /Chr 4	97429	1	Insertion		Frame Shift*	Bulunamadı		
putative calpain-like cysteine peptidase (n=1)	CP027826.1 Chr 27	181105	1	SNP /transversion	P -> Q	Substitution	Bulunamadı		

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
putative chloride channel protein (n=1)	CP027837.1 /Chr 4	377862	1	SNP /transversion	R -> P	Substitution	Bulunamadı		
putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2 (n=1)	CP027826.1 Chr 27	206348	1	SNP /transversion		Truncation*	Bulunamadı		
putative DEAD/DEAH box helicase (n=1)	CP027832.1 /Chr 32	1408265	1	SNP /transition	K -> R	Substitution	Bulunamadı		
putative delta-1-pyroline-5-carboxylate dehydrogenase (n=1)	CP027829.1 /Chr 3	51650	1	SNP /transversion	N -> K	Substitution	Bulunamadı		
putative DNA repair and recombination protein,mitochondrial precursor (n=1)	CP027809.1 /Chr 11	101036	1	SNP /transversion	E -> D	Substitution	Bulunamadı		
putative endomembrane protein (n=1)	CP027811.1 /Chr 13	464402	1	SNP /transition	V -> A	Substitution	Bulunamadı		
putative flagellum transition zone component (n=1)	CP027836.1 /Chr 36	2381220	1	SNP /transition	I -> T	Substitution	Bulunamadı		

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
putative folate/biopterin transporter (n=10)	CP027808.1 /Chr 10	162902	1	SNP /transition	E -> K	Substitution	Bulunamadı		
		162944	1	SNP /transversion	Y -> N	Substitution			
		163058	1	SNP /transversion	S -> T	Substitution			
		162979	4	Substitution	LR -> LY	Substitution			
		162939	3	Substitution	GC -> AS	Substitution			
		162926	1	SNP /transition	I -> V	Substitution			
		162915	1	SNP /transition	P -> L	Substitution			
		162920	1	SNP /transversion	V -> F	Substitution			
		163006	1	SNP /transversion	M -> I	Substitution			
		163049	1	SNP /transition	P -> S	Substitution			

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
putative kinesin K39 (n=9)	CP027812.1 /Chr 14	483769	1	SNP /transition	R -> Q	Substitution	Abass ve ark., 2013	Leishmania kinesinleri immünodominant proteinlerdir. Rekombinant kinesin 39 (rK39) antijeni ticari olarak leishmania serolojisinde kullanılmaktadır.	Tanı
		486258	1	SNP /transition	A -> T	Substitution			
		483743	1	SNP /transversion	E -> D	Substitution			
		483779	1	SNP /transversion	E -> D	Substitution			
		483781	1	SNP /transversion	C -> S	Substitution			
		492772	1	SNP /transversion	G -> A	Substitution			
		483755	2	Substitution	AA -> AT	Substitution			
		483751	1	SNP /transition	K -> R	Substitution			
		483721	1	SNP /transition	T -> M	Substitution			

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
putative nucleolar RNA-binding protein (n=1)	CP027840.1 /Chr 7	519684	1	Deletion		Frame Shift*	Bulunamadı		
putative peroxisomal membrane protein 4 (n=8)	CP027825.1 /Chr 26	935189	2	Deletion		Frame Shift*	Bulunamadı		
		935192	1	SNP /transition	F -> S	Substitution			
		935204	1	SNP /transition	V -> A	Substitution			
		935209	1	SNP /transition	F -> L	Substitution			
		935212	1	Insertion		Frame Shift*			
		935217	1	SNP /transversion	W -> C	Substitution			
		935225	1	SNP /transition	L -> P	Substitution			
putative phosphatidylinositol (3,5) kinase (n=1)	CP027826.1 Chr 27	935201	2	Substitution	L -> P	Substitution			
		366789	1	SNP /transition	V -> A	Substitution	Bulunamadı		

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
putative PI3-kinase (n=1)	CP027823.1 /Chr 24	770104	1	SNP /transition	L -> F	Substitution	Bulunamadı		
putative poly(A)-binding protein 3 (n=1)	CP027824.1 /Chr 25	21195	1	SNP /transversion	L -> R	Substitution	Bulunamadı		
putative propionyl-coa carboxylase beta chain (n=2)	CP027827.1 /Chr 28	83223	2	Substitution		Extension	Bulunamadı		
		83219	2	Substitution	N -> D	Substitution			
putative proteasome beta 2 subunit (n=1)	CP027836.1 /Chr 36	88202	1	SNP /transversion	Q -> H	Substitution	Bulunamadı		
putative protein kinase (n=6)	CP027819.1 /Chr 20	386513	1	SNP /transition	A -> T	Substitution	Bulunamadı		
		575422	1	SNP /transition	R -> C	Substitution			
		152963	3	Substitution	DX -> AX	Substitution			
		152971	1	Insertion		Frame Shift*			
		467057	1	SNP /transversion	T -> N	Substitution			
		152940	6	Substitution	GKR -> GGG	Substitution			

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
putative proteophosphoglycan ppg3 (n=5)	CP027835.1 /Chr 35	180007	2	Substitution	A -> T	Substitution	Bulunamadı		
		179333	1	SNP /transition	V -> A	Substitution			
		183131	1	SNP /transversion	R -> P	Substitution			
		184779	1	Insertion		Frame Shift*			
		184773	1	Insertion		Frame Shift*			
putative PUF1 (n=1)	CP027836.1 /Chr 36	11811	1	SNP /transition	F -> L	Substitution	Bulunamadı		
putative glycine dehydrogenase (n=1)	CP027825.1 /Chr 26	7870	1	Insertion		Frame Shift*	Bulunamadı		
putative ribonucleoside-diphosphate reductase large chain (n=1)	CP027827.1 /Chr 28	333494	1	SNP /transition	V -> A	Substitution	Bulunamadı		
putative RNA binding protein (n=3)	CP027832.1 /Chr 32	263889	1	SNP /transversion	A -> D	Substitution	Daneshvar ve ark., 2012	Gentamisin için hedef bölge olabileceği gösterilmiş	İlaç hedefi
		264164	1	SNP /transition	V -> M	Substitution			

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
		264224	1	SNP /transition	E -> K	Substitution			
putative RNA helicase (n=1)	CP027842.1 /Chr 9	21375	1	SNP /transition	A -> V	Substitution	Bulunamadı		
putative sodium/sulphate symporter (n=1)	CP027827.1 /Chr 28	1136928	1	SNP /transition	A -> V	Substitution	Bulunamadı		
putative surface antigen protein 2 (n=22)	CP027810.1 /Chr 12	430384	1	Deletion		Frame Shift*	Bulunamadı		
		388024	1	SNP /transition	V -> M	Substitution			
		388091	1	SNP /transversion	T -> K	Substitution			
		388101	1	SNP /transversion	S -> R	Substitution			
		388354	2	Substitution	S -> K	Substitution			
		388297	2	Substitution	V -> T	Substitution			
		388321	3	Substitution	E -> S	Substitution			
		388345	3	Substitution	RD -> RN	Substitution			

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
		388364	5	Substitution	RV -> NK	Substitution			
		388312	4	Substitution	VI -> IA	Substitution			
		388172	1	SNP /transversion	G -> A	Substitution			
		388601	1	SNP /transition	V -> A	Substitution			
		388304	7	Substitution	KAT -> TQR	Substitution			
		388357	2	Substitution	T -> L	Substitution			
		388075	1	SNP /transversion	S -> A	Substitution			
		388093	1	SNP /transversion	S -> A	Substitution			
		388240	1	SNP /transversion	L -> V	Substitution			
		388290	1	SNP /transversion	D -> E	Substitution			
		388361	2	Substitution	E -> G	Substitution			

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
		388300	2	Substitution	K -> S	Substitution			
		388167	2	Substitution	SL -> SV	Substitution			
		388175	2	Substitution	T -> I	Substitution			
putative target of rapamycin (TOR) kinase 1 (n=1)	CP027836.1 /Chr 36	2423355	1	SNP /transversion	F -> L	Substitution	Bulunamadı		
putative target SNARE (n=1)	CP027827.1 /Chr 28	564739	1	Insertion		Frame Shift*	Bulunamadı		
putative U1 small nuclear ribonucleoprotein (n=1)	CP027814.1 /Chr 16	660802	1	Insertion /tandem repeat		Frame Shift*	Bulunamadı		
putative ubiquinone biosynthesis protein-like protein (n=2)	CP027842.1 /Chr 9	537224	1	SNP /transversion	N -> Y	Substitution	Bulunamadı		
		537010	1	SNP /transition	R -> H	Substitution			
putative X-pro, dipeptidyl-peptidase,serine	CP027827.1 /Chr 28	771551	1	SNP /transition	I -> V	Substitution	Bulunamadı		

Çizelge 4.1. (Devam) Lin_TR01 Genomunda Polimorfizm Saptanan Proteinlerle İlgili PubMed Taraması ve Değerlendirme.

Polimorfizm Saptanan Protein (Ürün)	Lin_TR01 Erişim Numarası /Kromozom (Chr)	Polimorfizmin Kromozom Üzerindeki Yeri (5'-bp)	Polimorfizm Boyutu (bp)	Polimorfizm Tipi	Amino Asit Değişikliği	Proteine Etkisi	İlgili Yayınlar	Açıklamalar	Etki Sınıflaması
peptidase, Clan SC, family S15 (n=1)									
related to elongation factor-2 kinase efk-1b isoform-like protein (n=1)	CP027836.1 /Chr 36	1755201	1	SNP /transversion	H -> P	Substitution	Bulunamadı		
WD-repeat protein (n=1)	CP027826.1 Chr 27	1021164	1	SNP /transversion	D -> E	Substitution	Fernandez-Prada ve ark., 2018	WD-repeat protein ailesinden bazı gen lokuslarında yeni ilaç direnci mekanizmaları saptanmış	İlaç direnci

*Lin_TR01 genomunda saptanan ve proteine etkisi bakımından önemli olabilecek polimorfizmler.

n: Aynı protein üzerinde meydana gelen toplam polimorfizm sayısı.

İlk olarak, burada ele alınan 166 adet polimorfizm 63 farklı protein üzerinde meydana gelmiş olup; bunların 20'si $n>1$, 43'ü ise $n=1$ şeklindedir (n , aynı protein üzerinde meydana gelen toplam polimorfizm sayısı). Literatür taramasında 63 proteinin 14'ü ile ilgili çalışma yapıldığı saptanırken; geriye kalan 49'u ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buradaki 166 polimorfizm içerisinde 26 yüksek olasılıkla protein fonksiyonunu değiştiren ya da sentezini kesintiye uğratan mutasyon, 16 farklı protein üzerinde meydana gelmiş olup; bunlardan sadece üçü ile ilgili çalışmaya rastlanılmıştır. Geriye kalan 140 *substitution* veya *extension* tipi mutasyon 47 farklı protein üzerinde meydana gelmiş olup, bunlardan da 11'i ile ilgili çalışma bulunmaktadır. Mutasyon saptığımız ve hakkında daha önce çalışma yapılan 14 proteinin 5'i virülansla ilişkili, 2'si aşı adayı, 4'ü tanı/teplendirme ile ilişkili, 2'si ilaç direnci, 3'ü ilaç hedefi ve 1'i yaşamsal fonksiyon ile ilişkilidir. Burada bahsi geçen proteinler ile ilgili farklı çalışmalarda farklı fonksiyonlar ele alınmıştır. Örneğin virülans ile ilişkili olan 5 proteinden biri aynı zamanda aşı adayı olarak değerlendirilmişken; bir diğerinin aynı zamanda serolojik tanıda rolü olabileceği gösterilmiş olup (Çizelge 4.1), aşağıda detaylı olarak tartışılacaktır.

Yirmi altı yüksek olasılıkla protein sentezi üzerine etki eden ve hakkında daha önce çalışma yapılmış olan üç protein; *chaperone protein-like protein* ($n=1$), “*metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3*” ($n=1$) ve *elongation factor 2* ($n=5$)'dir. “*Chaperone*”lar ve *metallo-peptidase* virülans ile ilişkili proteinlerdir. Metallopeptidaz, konak hücrenin koruyucu protein ve peptitlerinin yıkımı ile ilişkili iken, *chaperone* parazitin sağkalımını artırmaktadır (da Fonseca Pires ve ark., 2014). Ayrıca *Metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3*, Lima ve ark. (2017), tarafından kutanöz leishmaniosisın serolojik tanısı için aday protein olarak değerlendirilmiştir. Lin_TR01 genomunda *chaperone protein-like protein* kodlayan bölge üzerinde meydana gelen mutasyonun tipi kesilme (*truncation*) olup, bu proteinin sentezinin kısmen veya tamamen duracağı aşıkardır. Diğer yandan *metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3* kodlayan bölge üzerinde çerçeve kayması (*frame shift*) mutasyon proteinin sentezini durdurabileceği gibi, fonksiyonunu bozabilir veya değiştirebilir. Pubmed taramasında *elongation factor 2* ile ilgili iki çalışmaya rastlanılmıştır. Agallou ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada *elongation factor 2*'nin immünojenik özelliğinden

dolayı aşı adayı olabileceğini ileri sürmüşler, Moreira ve Murta (2016) ise leishmanisidal direnç mekanizmasında rolü olduğunu göstermişlerdir. Bu proteinin üzerinde beş farklı bölgede mutasyon saptanmıştır. Bunlardan ikisi yüksek olasılıklı etki kapsamında değerlendirilen 26 mutasyon içerisinde olup, *truncation* ve *frame shift* tiplerinde geriye kalan üçü ise *substitution* tipindedir. Buradan da anlaşılacağı üzere kesilme tipi mutasyonun etkisi ile üzere protein sentezi belli bir noktada duracağı ve fonksiyonunu yerine getiremeyeceği rahatlıkla yorumlanabilir.

PubMed taramasında, bu çalışmada saptanan ve yüksek olasılıkla protein üretimi ya da fonksiyonu üzerine etki edebilecek tipte 26 mutasyondan 22'sinin etki ettiği 13 protein hakkında ise hergani bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu proteinler; *beta-ketoacyl-CoA synthase* (n=5), *proteophosphoglycan ppg4* (n=3), *putative 60S acidic ribosomal protein P2* (n=8), *putative beta-fructofuranosidase* (n=1), *putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2* (n=1), *putative nucleolar RNA-binding protein* (n=1), *putative peroxisomal membrane protein 4* (n=8), *putative protein kinase* (n=6), *putative proteophosphoglycan ppg3* (n=5), *putative glycine dehydrogenase* (n=1), *putative surface antigen protein 2* (n=22), *putative target SNARE* (n=1) ve *putative U1 small nuclear ribonucleoprotein* (n=1)'dir. Toplam polimorfizm sayısı (n), >1'in üzerinde olan proteinlerde ek olarak bulunan *substitution* ve/veya uzama tipi mutasyonların protein üzerinde kümülatif etkilere neden olabileceğini söylemek mümkündür. Nitekim *putative surface antigen protein 2* üzerinde biri *frame shift* olmak üzere toplam 22 bölgede mutasyon meydana gelmiştir. Başta çerçeve kayması tipi olmak üzere burada meydana gelen mutasyonların etkisiyle bir yüzey antijeni olan *putative surface antigen protein 2*'nin sentezinin durabileceği ya da fonksiyonunun değişebileceği ve bunun da parazit-konak interaksyonu üzerine etki edebileceği muhtemeldir. He ne kadar bunu doğrulamak için ilave çalışmalara ihtiyaç olsa da bu etkileşimin “Neden *L. infantum* kutanöz leishmaniosise yol açmıştır?” sorusuna bir cevap olabileceği akılda tutulmalıdır. Çeşitli kaynaklarda bahsi geçen *promastigote surface antigen 2* (rPSA-2) günümüzde saflaştırılmış ve rekombinant halde serodiagnostik testlerde kullanılmaktadır (Kamoun-Essghaier ve ark., 2005). Ancak çalışmamızda mutasyon saptadığımız *putative surface antigen protein 2*, rPSA-2 ile identik değildir.

Yukarıda da bahsedildiği üzere PubMed taramasında 140 *substitution* veya *extension* tipi mutasyon saptanan 47 farklı proteinin 11'i ile ilgili çalışmaya rastlanılmıştır. Bu proteinler; *amastin-like protein* (n=6), *ATP-binding cassette protein subfamily C, member6* (n=1), *choline kinase* (n=1), *dynein heavy chain, point mutation* (n=1), *glucose-6-phosphate isomerase* (n=1), *GP63, leishmanolysin* (n=1), *polyubiquitin* (n=10), *putative amino acid transporter* (n=1), *putative kinesin K39* (n=9), *putative RNA binding protein* (n=3), *WD-repeat protein* (n=1)'dir.

ATP-binding cassette protein subfamily C, member6 (n=1), *amastin-like protein* (n=6) ve *GP63, leishmanolysin* (n=1) virülansla ilişkili proteinler olup, tümünde *substitution* tipi mutasyon mevcuttur. Zhang ve Matlashewski (2012) tarafından *ATP-binding cassette protein subfamily C, member6*'nın deneysel olarak delesyonunun hipervirülansa yol açtığı gösterilmiştir. *Amastin-like gene, cysteine protease B* (CPB), *lipophosphoglycan* LPG3 ve *leishmanolysin* GP63 genleri parazitin virülansındaki rolleri iyi bilinen genlerdir (Azizi ve ark., 2009). Lin_TR01 *amastin-like protein* üzerinde altı farklı bölgede *substitution* tipi mutasyon meydana gelmiştir. Bir çinko metallopeptidaz olan GP63 (*leishmanolysin*, MSP veya PSP), *Leishmania*'nın başlıca *insect-stage* yüzey proteinidir. Parazitin konak hücrelerine reseptör aracılı girişinde rol oynar ve kompleman aracılı lizise karşı direnci artırır (Ivens ve ark., 2005). Contreras ve ark. (2010), yaptıkları bir çalışmada GP63'ün virülans ile ilişkili yeni bir rolünü ortaya çıkarmışlar, GP3'ün konak makrofajı AP-1 aktivitesini yıkıma uğratarak virülans rol oynayan bir yüzey proteazı olduğu göstermişlerdir. Diğer yandan Sinha ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada GP63'ün visceral leishmaniosis de önemli bir aşı adayı protein olarak nitelendirmişlerdir. Bizim çalışmamızda GP63 geninde SNP tipi polimorfizm (TTC-TAC) sonucu, protein kodlayan bölge üzerinde *substitution* tipi mutasyon saptanmıştır. Buradaki mutasyonların protein sentezi üzerine etkisinin anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olmakla birlikte virülans üzerine etki edebileceği de akılda tutulmalıdır. Nitekim Lin_TR01 suşu beklenenin aksine kutanöz leishmaniosise yol açan bir suştur.

Putative kinesin K39 (n=9), *polyubiquitin* (n=10) ve *glucose-6-phosphate isomerase* (n=1) tanı ve/veya tiplendirme ile ilişkili proteinler olup, tümünde *substitution* tipi mutasyon saptanmıştır. *Leishmania* kinesinleri immünodominant proteinler olup, rekombinant kinesin 39 (rK39) antijeni ticari olarak *Leishmania* serolojisinde olarak kullanılmaktadır (Abass ve ark., 2013). *Polyubiquitin* VL serolojisi için kullanılabileceği düşünülen bir protein olmakla beraber, tek başına serodiagnosis için tek başına yeterli bulunmamıştır (Oliveira ve ark., 2011). *Glucose-6-phosphate isomerase*, *Leishmania donovani* kompleks MON (multilokus enzim elektroforezi) tiplendirmesinde kullanılan enzimlerden biridir (Awadalla ve ark., 1987; Mauricio ve ark., 2006; Pesson ve ark., 2004). Ayrıca, *glucose-6-phosphate-isomerase* geni, leishmaniosisın real-time PCR ile tanısında kullanılmaktadır (Coleman ve ark., 2009; Wortmann ve ark., 2005).

WD-repeat protein ilaç direnci ile ilişkili bir proteindir. Fernandez-Prada ve ark. (2018), tarafından yapılan bir çalışmada *WD-repeat protein* ailesinden bazı gen lokuslarında yeni ilaç direnci mekanizmaları saptanmış ve *WD-repeat protein* ailesi SEC13 üyesi olan yeni bir *amastigote-specific miltefosine-resistance gene* (LinJ.32.0050) ve *antimony-resistance gene* (LinJ.06.1010) tanımlanmıştır. *Choline kinase* (n=1), *dynein heavy chain* (n=1) ve *putative RNA binding protein* (n=3) ise yeni ilaçlar için hedef bölge olarak değerlendirilmiştir. *Choline kinase* hücre zarı sentezinde görevli bir enzim olup, inhibe edilerek yeni leishmanisidal ilaçlar için hedef bölge olabileceği gösterilmiştir (Pulido ve ark., 2017). Dyneinler ise siliya ve flagella hareketi, nükleer göç, mitotik splinin organizasyonu ve mitoz sırasında kromozom ayrılması gibi temel süreçleri yöneten önemli proteinlerdir (Adhiambo ve ark., 2005; Dea-Ayuela ve ark., 2008). Bu nedenle leishmanisidal ilaçlar için yeni bir hedef bölge olabileceği düşünülmüştür (Dea-Ayuela ve ark., 2008). Daneshvar ve ark. (2012), tarafından yapılan bir çalışmada ise *putative RNA binding protein*'in gentamisin için hedef bölge olabileceği gösterilmiştir.

PubMed taramasında 140 *substitution* veya *extension* tipi mutasyon saptanan 47 farklı proteinin hakkında çalışma saptanan 11'i içerisinde son olarak *putative amino acid transporter* yer almaktadır. *Putative amino acid transporter* (n=1) parazitin

yaşamsal fonksiyonları ile ilişkili olup, Geraldo ve ark. (2005), tarafından konakçıda bulunan amastigot formunda amino asit tutulumundan sorumlu bir protein olarak tanımlanmıştır. Yapılan literatür taramasında bu bölümde tartışılan 47 proteinden geriye kalan 36'sı hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bunlar arasında özellikle *multi drug resistance protein-like* (n=1) hakkında çalışmaya rastlanılmaması oldukça dikkat çekici olup, bu tür çalışmalarda bilim dünyasının ne kadar yolun başında olduğu hakkında bize fikir veren bir örnek teşkil etmektedir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Günümüzde *Leishmania* türleri üzerinde yapılan tüm genom dizileme çalışmaları oldukça sınırlı olup, sadece birkaç *Leishmania* türünün yüksek kalite ve tamamlanmış genomu bulunmaktadır. *Leishmania infantum*'un ise ilk kez 2007 yılında Peacock ve ark. (2007), tarafından tüm genom dizisi çıkarılmış ve *L. infantum* JPCM5 referans suşu olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışmada ülkemizde ilk defa kutanöz leishmaniosis olgusundan izole edilen *Leishmania infantum*'un tüm genom dizisi çıkarılmış ve ardından elde edilen genomik DNA, NCBI GenBank'a (www.ncbi.nlm.nih.gov) yüklenerek ***Leishmania infantum*_TR01 (Lin_TR01)** ismi ile tescillenmiştir. Böylelikle **bu çalışmada hedeflenen amaca başarı ile ulaşılmıştır**. Bu konuda yapılan WGS çalışmaları incelendiğinde, Lin_TR01 suşu kutanöz leishmaniosis olgusundan izole edilmiş olması açısından bir ilktir. Zira referans genom olan *L. infantum* JPCM5 (Peacock ve ark., 2007) suşu türün klasik doku ve organ tropizmine uygun olarak visseral leishmaniosis olgusundan elde edilmiştir. Diğer yandan Lin_TR01, JPCM5 suşundan bu yana dünya genelinde tüm genomu dizilenen ikinci suş olma niteliğindedir. Lin_TR01 genomu elde edilen diğer genomlar ile karşılaştırıldığında seviye olarak *complete* durumda olan tek *Leishmania infantum* tüm genom dizisidir. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/249>).

Çalışmamızı planlarken parazitin tüm genomunu elde edip-edemeyeceğimizi, elde edebilirsek referans genom ile arada ne ölçüde fark saptanacağını, fark saptanırsa bunların anlamlı olup-olmayacağını bilmiyorduk. Dolayısıyla elde edilen mutasyonların değerlendirilmesi konusu bu tezin kapsamına alınmamıştır. Ancak geldiğimiz noktada *L. infantum*'un 32.009.138 baz çifti büyüklüğünde tüm genom dizisi çıkarılmış, Lin_TR01 ile referans genom arasında 3153 adet polimorfik bölge saptanmıştır. Dolayısıyla elde edilen polimorfizmlerin değerlendirilebilmesi için de elimizde bir veri havuzu oluşmuştur.

Çalışmamızda elde ettiğimiz genomik DNA referans suş ile karşılaştırıldığında saptanan 3153 polimorfizm içerisinde **166 adet fonksiyonu bilinen protein üretimini kodlayan bölge polimorfizmleri** bulgular bölümü Çizelge 3.1’de detaylı olarak gösterilmiştir. Ardından 166 adet polimorfizmin etkilediği 63 farklı protein (- bunların 20’si $n>1$, 43’ü ise $n=1$ şeklinde olup; n , aynı protein üzerinde meydana gelen toplam polimorfizm sayısını ifade etmektedir-) hakkında **PubMed veritabanı kullanılarak literatür taraması yapılmış ve aynı protein üzerinde meydana gelen mutasyon sayısı, yeri, boyutu ve tipi, konu ile ilgili daha önce çalışma yapıp yapılmadığı, yapılmış ise çalışma ile ilgili kısa açıklama ve konusu** tartışma bölümü Çizelge 4.1’de özetlenmiştir. Literatür taramasında 63 proteinin 14’ü ile ilgili çalışma yapıldığı saptanırken; geriye kalan 49’u ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Burada bahsi geçen 14 proteinin 5’i virülansla ilişkili, 2’si aşı adayı, 4’ü tanı/teplendirme ile ilişkili, 2’si ilaç direnci, 3’ü ilaç hedefi ve 1’i yaşamsal fonksiyon ile ilişkilidir. Ayrıca bu çizelgelerde 26 adet yüksek olasılıkla proteinin yapısını etkileyebilecek veya üretimini durdurabilecek “*frame shift, truncation* ve *insersiyon*” tipi polimorfizmler “*” ile işaretlenmiş ve ilgili bölümlerde ayrıca ele alınmıştır.

Buradaki 166 polimorfizm içerisinde 26 yüksek olasılıkla protein fonksiyonunu değiştiren ya da sentezini kesintiye uğratan mutasyon, 16 farklı protein üzerinde meydana gelmiş olup, bunlardan sadece üçü ile ilgili çalışmaya rastlanılmıştır. Bunlar; *chaperone protein-like protein* ($n=1$), “*metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3*” ($n=1$) ve *elongation factor 2* ($n=5$)’dir. “*Chaperone*”lar ve *metallo-peptidase* virülans ile ilişkili proteinlerdir. Diğer yandan *elongation factor 2*’nin farklı çalışmalarda aşı adayı ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Geriye kalan hakkında çalışmaya rastlamadığımız ancak etki gücü yüksek olan mutasyon saptadığımız 13 protein arasında özellikle *surface antigen protein 2* ilginizi çekmiştir. *Putative surface antigen protein 2* üzerinde biri *frame shift* olmak üzere toplam 22 bölgede mutasyon meydana gelmiştir. Başta çerçeve kayması tipi olmak üzere burada meydana gelen mutasyonların etkisiyle bir yüzey antijeni olan *putative surface antigen protein 2*’nin sentezinin durabileceği ya da fonksiyonunun değişebileceği ve bunun da parazit-konak interaksyonu üzerine etki edebileceği

muhtemeldir. Diğer yandan virülansla ilişkili *chaperone protein-like protein* kodlayan bölge üzerinde meydana gelen mutasyonun tipi kesilme (*truncation*) olup, bu proteinin sentezinin kısmen veya tamamen duracağı ve *metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3* kodlayan bölge üzerinde çerçeve kayması (*frame shift*) mutasyon proteinin sentezini durdurabileceği gibi, fonksiyonunu bozabilir veya değiştirebileceği aşıkardır.

PubMed taramasında 140 *substitution* veya *extension* tipi mutasyon saptanan 47 farklı proteinin 11'i ile ilgili çalışmaya rastlanılmıştır. (i) *ATP-binding cassette protein subfamily C, member6* (n=1), *amastin-like protein* (n=6) ve *GP63, leishmanolysin* (n=1) virülansla ilişkili (ii) *putative kinesin K39* (n=9), *polyubiquitin* (n=10) ve *glucose-6-phosphate isomerase* (n=1) tanı ve/veya tiplendirme ile ilişkili (iii) *WD-repeat protein* ilaç direnci ile ilişkili (iv) *choline kinase* (n=1), *dynein heavy chain* (n=1) ve *putative RNA binding protein* (n=3) ise yeni ilaçlar için hedef bölge (v) *putative amino acid transporter* (n=1) parazitin yaşamsal fonksiyonları ile ilişkili proteinlerdir. Bunlar arasında virülans ile ilişkili proteinler özellikle dikkati çekmekte olup, mutasyon tipinin *substitution* veya *extension* olması protein üzerinde önemli bir etki oluşmayacağı anlamına gelmemektedir. Yapılan literatür taramasında bu bölümde tartışılan 47 proteinden geriye kalan 36'sı hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bunlar arasında özellikle *multi drug resistance protein-like* (n=1) hakkında çalışmaya rastlanılmaması oldukça dikkat çekici olup, bu tür çalışmalarda bilim dünyasının ne kadar yolun başında olduğu hakkında bize fikir veren bir örnek teşkil etmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada ülkemizde ilk defa kutanöz leishmaniosis olgusundan izole edilen *Leishmania infantum*'un tüm genom dizisi çıkarılmış ve ardından elde edilen genomik DNA, *NCBI GenBank*'a (www.ncbi.nlm.nih.gov) yüklenerek *Leishmania infantum_TR01 (Lin_TR01)* ismi ile tescillenmiştir. Böylelikle **bu çalışmada hedeflenen amaca başarı ile ulaşılmıştır**. Ardından 3153 polimorfizm içerisinden **166 adet fonksiyonu bilinen protein üretimini kodlayan bölge polimorfizmleri** değerlendirilmiş ve proteinler üzerine olası etkileri varsa daha önceden yapılmış çalışmalarla birlikte kapsamlı bir şekilde sunulmuştur. Her ne kadar proteinler üzerinde meydana gelen mutasyonların etkilerini doğrulamak için protein

ekspresyonu gibi ilave çalışmalara ihtiyaç duyulsa da bu çalışma açısından virülans ile ilişkili mutasyonların biri veya tamamının “Neden *L. infantum* kutan leishmaniosis'e yol açmıştır?” sorusuna cevap olabileceği akılda tutulmalıdır.

Bundan sonraki aşamada polimorfizmlerin protein üzerindeki etkisinin doğrulanması için protein ekspresyonu gibi ilave deneylere ve biyoinformatik araçlar kullanılarak yapılabilecek ilave analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu konuda çalışmak isteyen araştırmacılar izelge 4.1'i inceleyerek ilgilendikleri proteinler ile ekspresyon ve/ya protein modelleme çalışması yapmalarını önermekteyiz.

Bu çalışmada elde edilen veriler esasen *Leishmania* genomu konusunda önümüzde katedilecek daha çok yol olduğunu gösterse de, çalışmamızın bilime katkı sağlayacağı, ülkemizde yapılacak *Leishmania* genom çalışmaları için bir temel oluşturacağı ve global düzlemdeki çalışmalara katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

ÖZET

Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile Türkiye'den İzole Edilen Kutanöz Leishmaniosis Etkeni *Leishmania infantum*'un Genom Dizisinin Çıkarılması

Leishmania subgenus *Leishmania*, insan ve hayvanlarda deri ve iç organları tutabilen sistemik kronik bir hastalık olan "leishmaniosis" in etkenidir. Hastalık insanlarda genel olarak üç farklı klinik tablo [(visseral, Kala-Azar, VL) kutanöz (CL) ve mukokutanöz leishmaniosis (MCL)] ortaya çıkmaktadır. Leishmaniosis, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre hala dünyanın en çok ihmal edilen hastalıklardan biridir. *Leishmania* tüm genomu dizisinin ilk kez çıkarılmasından bu yana ise sadece

10 yıllık bir zaman geçmiştir. Bununla beraber, doku tropizmindeki farklılıkların nedenleri gibi bilim insanları için hala aydınlatılması gereken birçok şey bulunmaktadır. Bu çalışmada "Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi" ile Türkiye'de kutanöz leishmaniosis olgusundan izole edilen *Leishmania infantum*'un tüm genom dizisinin çıkarılması amaçlanmıştır.

Genom sekanslama işlemi "Illumina HiSeq 2500" platformunda gerçekleştirilmiştir. Dizileme kütüphanelerini oluşturmak için, "Illumina HiSeq 2500" platformuyla uyumlu "TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep Kit" kullanılmıştır. Sentez ile dizileme (SBS), HiSeq Rapid SBS Kit v2 ile iki fragmanın uç uca birleştirilmesi ile edilen tek fragman okumaları (2 x 150 bp; PE) şeklinde gerçekleştirilmiştir. Biyoinformatik analizler Geneious 11.0.5. (www.genius.com) platformu ile yapılmıştır.

Çalışmamızda *L. infantum*'un yüksek kalitede tüm genom dizisi (WGS) başarı ile sekanslanmış ve 36 kromozoma ait toplam 32.009.138 baz çifti büyüklüğünde genomik DNA elde edilmiştir. Ardından elde edilen genomik DNA, *National Center for Biotechnology Information, USA, (NCBI) GenBank*'a (www.ncbi.nlm.nih.gov) yüklenerek ***Leishmania infantum*_TR01 (Lin_TR01)** ismi ile tescillenmiştir. Bu konuda yapılan WGS çalışmaları incelendiğinde, Lin_TR01 suşu kutanöz leishmaniosis olgusundan izole edilmiş olması açısından bir ilktir. Zira referans genom olan *L. infantum* JPCM5 (Peacock ve ark., 2007) suşu türün klasik doku ve organ tropizmine uygun olarak visseral leishmaniosis olgusundan elde edilmiştir. Diğer yandan Lin_TR01, JPCM5 suşundan bu yana dünya genelinde tüm genomu dizilenen ikinci suş olma niteliğindedir. Lin_TR01 genomu elde edilen diğer genomlar ile karşılaştırıldığında seviye olarak complete durumda olan tek *Leishmania infantum* tüm genom dizisidir. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/249>).

Lin_TR01 genomunun 36 kromozomuna ait NCBI tarafından verilen *accession* (erişim) numaraları "CP027807, CP027810, CP027808, CP027811, CP027809, CP027812, CP027813, CP027814, CP027817, CP027818, CP027819, CP027815, CP027821, CP027816, CP027823, CP027820, CP027822, CP027824, CP027825, CP027826, CP027827, CP027828, CP027829, CP027830, CP027831, CP027832, CP027833, CP027834, CP027835, CP027836, CP027837, CP027838, CP027839, CP027840, CP027841, CP027842" şeklindedir. Lin_TR01 genomunun anotasyonu sonucunda 3153 polimorfizm, 8324 Gen, 8199 CDS, 8109 mRNA, 67 tRNA, 11 rRNA ve 58 ncRNA bulunmuştur. Elde edilen 8199 CDS'nin 5278 tanesi hipotetik protein niteliğindedir. Bulunan 3153 polimorfik bölgenin 799'u *deletion*, 528 *insertion*, 511 *substitution* ve 1315'i ise SNP şeklindedir. Bu polimorfizmlerin 466'sının proteinler üzerine etkisi tespit edilmiş olup, bunların 3'ü delesyon (*deletion*), 5'i uzama (*extention*), 44'ü çerçeve kayması (*frame shift*), 2'si insersiyon (*insertion*), 299'ü substitüsyon (*substitution*), 11'i kesilme (*truncation*) ve 102'si ise etkisiz (*none*) olarak sınıflandırılmıştır. 3153 polimorfizm incelenmiş ve 166 tanesinin "fonksiyonu bilinen bir protein üretimini kodlayan bölge" üzerinde meydana geldiği tespit edilmiştir. Ardından 166 adet polimorfizmin etkilediği 63

farklı protein (-bunların 20'si $n>1$, 43'ü ise $n=1$ şeklinde olup; n , aynı protein üzerinde meydana gelen toplam polimorfizm sayısını ifade etmektedir-) hakkında PubMed veritabanı kullanılarak literatür taraması yapılmış ve aynı protein üzerinde meydana gelen mutasyon sayısı, yeri, boyutu ve tipi, konu ile ilgili daha önce çalışma yapıp yapılmadığı, yapılmış ise çalışma ile ilgili kısa açıklama detaylı bir şekilde özetlenmiştir. Literatür taramasında 63 proteinin 14'ü ile ilgili çalışma yapıldığı saptanırken geriye kalan 49'u ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Burada bahsi geçen 14 proteinin 5'i virülansla ilişkili, 2'si aşı adayı, 4'ü tanı/teplendirme ile ilişkili, 2'si ilaç direnci, 3'ü ilaç hedefi ve 1'i yaşamsal fonksiyon ile ilişkilidir.

Bu çalışmada elde edilen veriler esasen *Leishmania* genomu konusunda önümüzde katedilecek daha çok yol olduğunu gösterse de, çalışmamızın bilime katkı sağlayacağı, ülkemizde yapılacak *Leishmania* genom çalışmaları için bir temel oluşturacağı ve global düzlemdeki çalışmalara katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Sözcükler: CL-*Leishmania infantum*, Tüm Genom Dizileme, Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi.



SUMMARY

The Genome Sequencing with Next Generation Sequencing Technology of *Leishmania infantum* causing Cutaneous Leishmaniasis from Turkish isolate

Leishmania subgenus *Leishmania* is causing Leishmaniasis which is a chronic systemic disease in humans and animals can keep the skin and visceral organs. The disease generally constitute three different clinical table in humans [(visceral, Kala-Azar, VL) cutaneous (CL) ve mucocutaneous leishmaniasis (MCL)]. According to World Health Organization (WHO), Leishmaniasis is still one of the world's most neglected diseases. It has been nearly 10 years since the completion of the first entire genome sequence of a *Leishmania* parasite. However, there are still many things in the dark for scientists such as the causes of differences in tissue tropism. The aim of this study is to generate that the whole genome sequencing with next generation sequencing technology of *Leishmania infantum* causing cutaneous leishmaniasis from Turkish isolate.

Genomic sequencing was performed on the Illumina HiSeq 2500 platform. The "TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep Kit" compatible with the "Illumina HiSeq 2500" platform was used to create the library. Synthesis sequencing (SBS) was performed with HiSeq Rapid SBS Kit v2 in the form of single fragment readings (2 x 150 bp; PE) with two fragment end-to-end assemblies. Bioinformatics analyzes were performed Geneious 11.0.5. (www.genius.com) platform.

In our study, a high quality whole genome sequence (WGS) of *L. infantum* was successfully sequenced and a total of 32,009,137 base pairs of genomic DNA of 36 chromosomes were obtained. The resulting genomic DNA submitted to the National Center for Biotechnology Information, USA, (NCBI) GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) and registered under the name *Leishmania infantum*_TR01 (Lin_TR01). When the WGS studies on this subject are examined, Lin_TR01 strain is the first one to be isolated from cutaneous leishmaniasis. Because the reference genome, *L. infantum* JPCM5 (Peacock et al., 2007) was obtained from the visceral leishmaniasis case in accordance with the classical tissue and organ tropism of the species. On the other hand, Lin_TR01 is the second whole genome sequenced strain in the world since the JPCM5 strain. The Lin_TR01 genome is the only *Leishmania infantum* whole genome sequence that is complete level compared to the other genomes obtained. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/249>).

Accession numbers assigned by the NCBI of the 36 chromosomes of the Lin_TR01 genome are described in CP027807, CP027810, CP027808, CP027811, CP027809, CP027812, CP027813, CP027814, CP027817, CP027818, CP027819, CP027815, CP027821, CP027816, CP027823, CP027820, CP027822, CP027824, CP027825, CP027826, CP027827, CP027828, CP027829, CP027830, CP027831, CP027832, CP027833, CP027834, CP027835, CP027836, CP027837, CP027838, CP027839, CP027840, CP027841, CP027842. As the result of annotation with the Lin_TR01 genome were found 3153 polymorphisms, 8324 Gene, 8199 CDS, 8109 mRNA, 67 tRNA, 11 rRNA and 58 ncRNA. 5278 of 8199 CDS obtained are hypothetical proteins. Founded the 3153 polymorphism is included 799 deletion, 528 insertion, 511 substitution, and 1315 SNPs. The effect of 466 of the polymorphisms on proteins were determined; these are classified as 3 deletion, 5 extention, 44 frame shift, 2 insertion, 299 substitution, 11 truncation and 102 none. 3153 polymorphism examined, and it has been found that 166 of them occur on the "region of a known protein production coding". Following this, a literature review was conducted using the PubMed database, using 63 different proteins affected by 166 polymorphisms (20 of which were n> 1, 43 of them were n=1; n expressed the total number of polymorphisms on the same protein). The number of mutations, location, size and type of mutations on the same protein, whether or not the study

was performed previously, and the short description of the study were summarized in detail. In the literature search, it was determined that 14 of 63 proteins were studied and no study was found regarding the remaining 49. Of the 14 proteins mentioned here, 5 are related to virulence, 2 are vaccine candidate, 4 are related to diagnosis / typing, 2 are drug resistance, 3 are drug target and 1 are vital function.

Although the data obtained in this study show that there are more ways to be covered in the *Leishmania* genome, we believe that our study will contribute to science and will provide a basis for Leishmania genome studies in our country and contribute to the studies in the global platform.

Keywords: CL-*Leishmania infantum*, Next Generation Sequencing Technology, Whole Genome Sequencing.



KAYNAKLAR

- ABASS E, BOLLIG N, REINHARD K, CAMARA B, MANSOUR D, VISEKRUNA A, LOHOFF M, STEINHOFF U (2013). rKLO8, a novel *Leishmania donovani*-derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis* [Electronic Journal], **7(7)**: 1-10. e2322. doi: 10.1371/journal.pntd.0002322. Erişim Adresi: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3715527/pdf/pntd.0002322.pdf>]. Erişim Tarihi: 31/12/2018.
- ADHIAMBO C, FORNEY JD, ASAI DJ, LEBOWITZ JH (2005). The two cytoplasmic dynein-2 isoforms in *Leishmania mexicana* perform separate functions. *Mol Biochem Parasitol*, **143(2)**: 216-225.
- AFGAN E, CHAPMAN B, TAYLOR J. (2012). CloudMan as a platform for tool, data and analysis distribution. *BMC bioinformatics* [Electronic Journal], **13(315)**: 1-7. doi:10.1186/1471-2105-13-315. Erişim Adresi: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3556322/pdf/1471-2105-13-315.pdf>]. Erişim Tarihi: 31/12/2018.
- AGALLOU M, PANTAZI E, TSIFTSAKI E, TOUBANAKI DK, GAITANAKI C, SMIRLIS D, KARAGOUNI E (2018). Induction of protective cellular immune responses against experimental visceral leishmaniasis mediated by dendritic cells pulsed with the N-terminal domain of *Leishmania infantum* elongation factor-2 and CpG oligodeoxynucleotides. *Mol Immunol*, **30(103)**: 7-20. doi: 10.1016/j.molimm.2018.08.004.
- ANDREWS S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Erişim Adresi: [<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>]. Erişim Tarihi: 10/12/2018.
- AKOPYANTS NS, KIMBLIN N, SECUNDINO N, PATRICK R, PETERS N, LAWYER P, DOBSON DE, BEVERLEY SM, SACKS DL (2009). Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*, **324(5924)**: 265–268.
- AWADALLA HN, MANSOUR NS, MOHAREB EW (1987). Further characterization of *Leishmania* isolates from children with visceral infection in Alexandria area, Egypt. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **81(6)**: 915-917.
- AZIZI H, HASSANI K, TASLIMI Y, NAJAFABADI HS, PAPADOPOULOU B, RAFATI S (2009). Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans *Leishmania tarentolae*. *Parasitology*, **136(7)**: 723-735. doi: 10.1017/S0031182009005873. Epub 2009 May 6.
- BATES PA (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies, *Int. J. Parasitol*, **37**: 1097–1106.
- BRITTO C, RAVEL C, BASTIEN P, BLAINEAU C, PAGES M, DEDET JP, WINCKER P (1998). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between OldWorld and NewWorld *Leishmania* genomes. *Gene*, **222**: 107–117.
- BULLOCK-IACULLO S (1992). Detection of Blood Parasites. In: Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, ASM Press, Washington D.C. p:7.8.1-7.9.4.

- BURZA S, CROFT SL, BOELAERT M. *Leishmaniasis* (2018). *Lancet*, **392(10151)**: 951-970. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2. Epub 2018 Aug 17.
- CANTACESSI C, DANTAS-TORRES F, NOLAN MJ, OTRANTO D (2015). The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends Parasitol*, **31(3)**: 100-108. doi: 10.1016/j.pt.2014.12.012. Epub 2015 Jan 28.
- CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) (2018a). Erişim Adresi: [<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/diagnosis.html>]. Erişim tarihi: 10/12/2018.
- CDC (2018b). Erişim Adresi: [<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>]. Erişim tarihi: 10/12/2018.
- CDC (2018c). Erişim Adresi: [<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html>]. Erişim tarihi: 10/12/2018.
- COLEMAN RE, HOCHBERG LP, SWANSON KI, LEE JS, MCAVIN JC, MOULTON JK, EDDINGTON DO, GROEBNER JL, O'GUINN ML, PUTNAM JL (2009). Impact of phlebotomine sand flies on U.S. military operations at Tallil Air Base, Iraq: 4. Detection and identification of leishmaniaparasites in sand flies. *J Med Entomol*. **46(3)**: 649-63.
- CONTRERAS I, GÓMEZ MA, NGUYEN O, SHIO MT, MCMASTER RW, OLIVIER M. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathog* [Electronic Journal], **6(10)**: 1-14. e1001148. doi: 10.1371/journal.ppat.1001148. Erişim Adresi: [<https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1001148&type=printable>] Erişim Tarihi: 31/12/2018.
- COTA GF, DE SOUSA MR, DEMARQUI FN, RABELLO A (2012). The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* [Electronic Journal], **6(5)**: 1-11. e1665. doi: 10.1371/journal.pntd.0001665. Epub 2012 May 29. Erişim Adresi: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3362615/pdf/pntd.0001665.pdf>] Erişim Tarihi: 31/12/2018.
- DA FONSECA PIRES S, FIALHO LC JR, SILVA SO, MELO MN, DE SOUZA CC, TAFURI WL, BRUNA ROMERO O, DE ANDRADE HM (2014). Identification of virulence factors in *Leishmania infantum* strains by a proteomic approach. *J Proteome Res*. **13(4)**:1860-1872. doi: 10.1021/pr400923g. Epub 2014 Mar 24.
- DANESHVAR H, WYLLIE S, PHILLIPS S, HAGAN P, BURCHMORE R (2012). Comparative proteomics profiling of a gentamicin-attenuated *Leishmania infantum* cell line identifies key changes in parasite thiol-redox metabolism. *J Proteomics*, **75(5)**: 1463-1471. doi: 10.1016/j.jprot.2011.11.018. Epub 2011 Nov 28.
- DAWIT G, GIRMA Z, SIMENEW K (2013). A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *J Bacteriol Parasitol* [Electronic Journal], **4(2)**: 1-7. doi: 10.4172/2155-9597.1000166. Erişim Adresi: [<https://www.omicsonline.org/a-review-on-biology-epidemiology-and-public-health-significance-of-leishmaniasis-2155-9597.1000166.pdf>] Erişim Tarihi: 31/12/2018.
- DEA-AYUELA MA, PÉREZ-CASTILLO Y, MENESES-MARCEL A, UBEIRA FM, BOLAS-FERNÁNDEZ F, CHOU KC, GONZÁLEZ-DÍAZ H (2008). HP-Lattice QSAR for dynein proteins: experimental proteomics (2D-electrophoresis, mass spectrometry) and theoretic study of a *Leishmania infantum* sequence. *Bioorg Med Chem*, **16(16)**: 7770-7776. doi: 10.1016/j.bmc.2008.07.023. Epub 2008 Jul 13.

- DE RUITER CM, VAN DER VEER C, LEEFLANG MM, DEBORGGRAEVE S, LUCAS C, ADAMS ER (2014). Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *J Clin Microbiol*, **52(9)**: 3147-3155. doi: 10.1128/JCM.00372-14. Epub 2014 May 14.
- DESJEUX P (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, **27**: 305-318.
- DONOVAN C (1903). The etiology of one of the hetero geneous fevers of India. *BMJ*, **2**: 1401.
- DOWNING T, IMAMURA H, DECUYPERE S, CLARK TG, COOMBS GH, COTTON JA, HILLEY JD, DE DONCKER S, MAES I, MOTTRAM JC, QUAIL MA, RIJAL S, SANDERS M, SCHÖNIAN G, STARK O, SUNDAR S, VANAERSCHOT M, HERTZ-FOWLER C, DUJARDIN JC, BERRIMAN M (2011). Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Res*, **21**: 2143-2156.
- ECKERT J, FRIEDHOFF KT, ZAHNER H, DEPLAZES P (2008). Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin: 112 Tabellen, Georg Thieme Verlag, p: 632.
- EROGLUF, KOLTAS IS, ALABAZD, UZUN S, KARAKAS M (2015). Clinical manifestations and genetic variation of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* in Southern Turkey. *Exp Parasitol*, **154**: 67-74. doi: 10.1016/j.exppara.2015.04.014.
- FERNANDEZ-PRADA C, SHARMA M, PLOURDE M, BRESSON E, ROY G, LEPROHON P, OUELLETTE M (2018). High-throughput Cos-Seq screen with intracellular *Leishmania infantum* for the discovery of novel drug-resistance mechanisms. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, **8(2)**: 165-173. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.03.004. Epub 2018 Mar 16.
- GALAXY (2018). Center for Comparative Genomics and Bioinformatics at Penn State, the Department of Biology and at Johns Hopkins University and the Computational Biology Program at Oregon Health & Science University. Galaxy version 18.09, commit 51afe15f86c0f67e2e51fd0c67ba950a424f0983. Erişim Adresi: [<https://usegalaxy.org/>]. Erişim Tarihi: 11/12/2018.
- GENEIOUS (2018). Geneious version (11.0.5). Erişim Adresi: [<https://www.geneious.com/>]. Erişim Tarihi: 11/12/2018.
- GERALDO MV, SILBER AM, PEREIRA CA, ULIANA SR (2005). Characterisation of a developmentally regulated amino acid transporter gene from *Leishmania amazonensis*. *FEMS Microbiol Lett*, **242(2)**: 275-280.
- GIBSON ME (1983). The identification of kala-azar and the discovery of *Leishmania donovani*. *Med Hist*, **27**: 203-213.
- GOUZELOU E, HARALAMBOUS C, ANTONIOU M, CHRISTODOULOU V, MARTINKOVIĆ F, ŽIVIČNJAK T, SMIRLIS D, PRATLONG F, DEDET JP, ÖZBEL Y, TOZ SÖ, PRESBER W, SCHÖNIAN G, SOTERIADOU K (2013). Genetic diversity and structure in *Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. *Parasit Vectors* [Electronic Journal], **6(342)**: 1-19. doi: 10.1186/1756-3305-6-342. Erişim Adresi: [<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1756-3305-6-342>] Erişim Tarihi: 31/12/2018.
- GRAMICCIA M, GRADONI L (2005). The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol*, **35**: 1169-1180.

- HAILE S, PAPADOPOULOU B (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol*, **10**: 569–577.
- HEITMAN J (2006). Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Curr Biol*, **16(17)**: 711-725.
- HEYMANN MD, DAVID L (2008). Control of Communicable Diseases Manual. 19th Ed: David, L., Heymann, M.D., American Public Health Association, Washington DC. Erişim Adresi: [<http://www.austinc.edu/microbio/2993u/ld.htm>]. Erişim Tarihi: 11/12/2018.
- HPA UK STANDARDS FOR MICROBIOLOGY INVESTIGATIONS (2014): Investigation of Bone Marrow. Issued by the Standards Unit, Microbiology Services Division, HPA Bacteriology. Erişim Adresi: [http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317132858115]. Erişim Tarihi: 10/12/2018.
- İBRAHİM ME. The epidemiology of visceral leishmaniasis in east Africa: hints and molecular revelations. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002, **96 (suppl 1)**: 25–29.
- ILLUMINA (2018). TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep Kit (Katalog No: 20015964; Illumina). Erişim Adresi: [https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_truseq_nano_dna_sample_prep_kit.pdf]. Erişim Tarihi: 10/12/2018.
- IVENS AC, PEACOCK CS, WORTHEY EA, MURPHY L, AGGARWAL G, BERRIMAN M, SISK E, RAJANDREAM MA, ADLEM E, AERT R, ANUPAMA A, APOSTOLOU Z, ATTIPOE P, BASON N, BAUSER C, BECK A, BEVERLEY SM, BIANCHETTIN G, BORZYM K, BOTHE G, BRUSCHI CV, COLLINS M, CADAG E, CIARLONI L, CLAYTON C, COULSON RM, CRONIN A, CRUZ AK, DAVIES RM, DE GAUDENZI J, DOBSON DE, DUESTERHOEFT A, FAZELINA G, FOSKER N, FRASCH AC, FRASER A, FUCHS M, GABEL C, GOBLE A, GOFFEAU A, HARRIS D, HERTZ-FOWLER C, HILBERT H, HORN D, HUANG Y, KLAGES S, KNIGHTS A, KUBE M, LARKE N, LITVIN L, LORD A, LOUIE T, MARRA M, MASUY D, MATTHEWS K, MICHAELI S, MOTTRAM JC, MÜLLER-AUER S, MUNDEN H, NELSON S, NORBERTCZAK H, OLIVER K, O'NEIL S, PENTONY M, POHL TM, PRICE C, PURNELLE B, QUAIL MA, RABBINOWITSCH E, REINHARDT R, RIEGER M, RINTA J, ROBEN J, ROBERTSON L, RUIZ JC, RUTTER S, SAUNDERS D, SCHÄFER M, SCHEIN J, SCHWARTZ DC, SEEGER K, SEYLER A, SHARP S, SHIN H, SIVAM D, SQUARES R, SQUARES S, TOSATO V, VOGT C, VOLCKAERT G, WAMBUTT R, WARREN T, WEDLER H, WOODWARD J, ZHOU S, ZIMMERMANN W, SMITH DF, BLACKWELL JM, STUART KD, BARRELL B, MYLER PJ (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, **309**: 436–442.
- JAFFE CL (2007). Advances in molecular diagnosis of leishmaniasis. Annual Meeting of Israel Society for Parasitology, Protozoology and Tropical Diseases and The Second Regional Leishmaniasis Workshop, Tel Aviv, Israel.
- JERONIMO SMB, SOUSA QA, PEARSON RD (2005). *Leishmania* Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucocutaneous Leishmaniasis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed., Churchill Livingstone. Chapter 273.
- JGI (JOINT GENOME INSTITUTE) (2018). Erişim Adresi: [<https://jgi.doe.gov/>]. Erişim Tarihi: 11/12/2018.
- KAMOUN-ESSGHAIER S, GUIZANI I, STRUB JM, VAN DORSSELAER A, MABROUK K, OUELHAZI L, DELLAGI K (2005). Proteomic approach for characterization of immunodominant membrane-associated 30- to 36-kiloDalton fraction antigens of *Leishmania infantum* promastigotes,

- reacting with sera from Mediterranean visceral leishmaniasis patients. *Clin Diagn Lab Immunol*, **12(2)**: 310-320.
- KARAER Z, NALBANTOĞLU S (2015). Trypanosomatidae. Veteriner Protozooloji, Eds. N Dumanlı, Z Karaer, Medisan Yayınevi, Ankara, 23-43.
- KEARSE M, MOIR R, WILSON A, STONES-HAVAS S, CHEUNG M, STURROCK S, BUXTON S, COOPER A, MARKOWITZ S, DURAN C, THIERER T, ASHTON B, MENTJIES P, DRUMMOND A (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, **28(12)**: 1647-1649.
- KOHN CG (2007). Encyclopedia of Plague and Pestilence, 1st Ed. Infobase Publishing, New York.
- LEISHMAN WB (1903). On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *BMJ*, **1**: 1252-4.
- LEPROHON P, LEGARE D, RAYMOND F, MADORE E, HARDIMAN G, CORBEIL J, OUELLETTE M (2009). Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucl. Acids Res*, **37**: 1387–1399.
- LEPROHON P, FERNANDEZ-PRADA C, GAZANION É, MONTE-NETO R, OUELLETTE M (2014). Drug resistance analysis by next generation sequencing in *Leishmania*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, **5(1)**: 26-35. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.09.005. eCollection 2015.
- LIMA BS, PIRES SF, FIALHO LC JR, OLIVEIRA EJ, MACHADO-DE-AVILA RA, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, CHAPEAUROUGE AD, PERALES J, ANDRADE HM (2017). A proteomic road to acquire an accurate serological diagnosis for human tegumentary leishmaniasis. *J Proteomics*, **151**: 174-181. doi: 10.1016/j.jprot.2016.05.017. Epub 2016 Jun 1.
- LUKES J, MAURICIO IL, SCHÖNIAN G, DUJARDIN JC, SOTERIADOU K, DEDET JP, KUHL S, TINTAYA KW, JIRKŮ M, CHOCHOLOVÁ E, HARALAMBOUS C, PRATLONG F, OBORNÍK M, HORÁK A, AYALA FJ, MILES MA (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104(22)**: 9375-9380.
- LYE LF, OWENS K, SHI H, MURTA SM, VIEIRA AC, TURCO SJ, TSCHUDI C, ULLU E, BEVERLEY SM (2010). Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathog* [Electronic Journal], **6**: 1-13. e1001161. Erişim Adresi: [\[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2965760/pdf/ppat.1001161.pdf\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2965760/pdf/ppat.1001161.pdf). Erişim Tarihi: 31/12/2018.
- MAIA Z, LIRIO M, MISTRO S, MENDES CM, MEHTA SR, BADARO R (2012). Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* [Electronic Journal], **6(1)**: 1-8. e1484. Erişim Adresi: [\[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3269412/pdf/pntd.0001484.pdf\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3269412/pdf/pntd.0001484.pdf). Erişim Tarihi: 31/12/2018.
- MAURICIO IL, YEO M, BAGHAEI M, DOTO D, PRATLONG F, ZEMANOVA E, DEDET JP, LUKES J, MILES MA (2006). Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int J Parasitol*, **36(7)**: 757-769. Epub 2006 Apr 25.
- MILES MA, YEO M, MAURICIO IL (2009). Genetics: *Leishmania* exploit sex. *Science*, **324(5924)**: 187-189.

- MOREIRA DS ve MURTA SM (2016). Involvement of nucleoside diphosphate kinase b and elongation factor 2 in *Leishmania braziliensis* antimony resistance phenotype. *Parasit Vectors* [Electronic Journal], **9(641)**: 1-12. doi: 10.1186/s13071-016-1930-6. Erişim Adresi: [\[https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13071-016-1930-6\]](https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13071-016-1930-6). Erişim Tarihi: 31/12/2018.
- MUKHERJEE S (2018). Review of Literature: Leishmaniasis. Erişim Adresi: [\[http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/171475/7/07_review%20of%20literature.pdf\]](http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/171475/7/07_review%20of%20literature.pdf). Erişim Tarihi: 09/12/2018.
- NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION) (2018a). Erişim Adresi: [\[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Erişim Tarihi: 05/12/2018.
- NCBI (2018b). Erişim Adresi: [\[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/249?genome_assembly_id=368466\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/249?genome_assembly_id=368466). Erişim Tarihi: 11/12/2018.
- NCBI (2018c). Erişim Adresi: [\[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/249\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/249). Erişim Tarihi: 11/12/2018.
- OLIVEIRA GG, MAGALHÃES FB, TEIXEIRA MC, PEREIRA AM, PINHEIRO CG, SANTOS LR, NASCIMENTO MB, BEDOR CN, ALBUQUERQUE AL, DOS-SANTOS WL, GOMES YM, MOREIRA ED JR, BRITO ME, PONTES DE CARVALHO LC, DE MELO NETO OP (2011). Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, **85(6)**: 1025-1034. doi: 10.4269/ajtmh.2011.11-0102.
- ÖZBEL Y, TÖZ SÖ (2011). Parazitolojide Laboratuvar. In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). *Leishmaniasis*. 1. Baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir. 307-320.
- ÖZCEL MA (2007). *Leishmaniasis*. In: Özcel MA, Özbel Y, AK M. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 1. baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir. 197-241.
- PAŞA S, TETİK VARDARLI A, EROL N, KARAKUŞ M, TÖZ S, ATASOY A, BALCIOĞLU İC, EMEK TUNA G, ERMİŞ ÖV, ERTABAKLAR H, ÖZBEL Y (2015). Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. *Vet Parasitol*, **212(3-4)**: 389-392. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.07.042. Epub 2015 Aug 5.
- PEACOCK CS, SEEGER K, HARRIS D, MURPHY L, RUIZ JC, QUAIL MA, PETERS N, ADLEM E, TIVEY A, ASLETT M, KERHORNOU A, IVENS A, FRASER A, RAJANDREAM MA, CARVER T, NORBERTCZAK H, CHILLINGWORTH T, HANCE Z, JAGELS K, MOULE S, ORMOND D, RUTTER S, SQUARES R, WHITEHEAD S, RABBINOWITSCH E, ARROWSMITH C, WHITE B, THURSTON S, BRINGAUD F, BALDAUF SL, FAULCONBRIDGE A, JEFFARES D, DEPLEDGE DP, OYOLA SO, HILLEY JD, BRITO LO, TOSI LR, BARRELL B, CRUZ AK, MOTTRAM JC, SMITH DF, BERRIMAN M (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease, *Nat. Genet*, **39**: 839-847.
- PESSON B, READY JS, BENABDENNBI I, MARTÍN-SÁNCHEZ J, ESSEGHIR S, CADI-SOUSSI M, MORILLAS-MARQUEZ F, READY PD (2004). Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Med Vet Entomol*, **18(1)**: 25-37.
- PULIDO SA, NGUYEN VH, ALZATE JF, CEDEÑO DL, MAKURATH MA, RÍOS-VÁSQUEZ A, DUQUE-BENÍTEZ SM, JONES MA, ROBLEDO SM, FRIESEN JA (2017). Insights into the phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthetic pathways in *Leishmaniaparasites* and

characterization of a choline kinase from *Leishmania infantum*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **213**: 45-54. doi: 10.1016/j.cbpb.2017.07.008. Epub 2017 Jul 25.

RAYMOND F, BOISVERT S, ROY G, RITT JF, LEGARE D, ISNARD A, STANKE M, OLIVIER M, TREMBLAY MJ, PAPADOPOULOU B, OUELLETTE M, CORBEIL J (2012). Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucl. Acids Res*, **40**: 1131–1147.

REAL F, VIDAL RO, CARAZZOLLE MF, MONDEGO JM, COSTA GG, HERAI RH, WÜRTELE M, DE CARVALHO LM, CARMONA E FERREIRA R, MORTARA RA, BARBIÉRI CL, MIECZKOWSKI P, DA SILVEIRA JF, BRIONES MR, PEREIRA GA, BAHIA D. (2013) The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Res*, **20**: 567–581.

RESMİ GAZETE (2011). Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011–27893. Erişim Adresi: [\[http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/201104023.htm\]](http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/201104023.htm). Erişim Tarihi: 06/01/2014.

RIBEIRO RR, MICHALICK MSM, DA SILVA ME, DOS SANTOS CCP, FRÉZARD FJ4, DA SILVA SM (2018). Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *Biomed Res Int* [Electronic Journal], **2018**: 1-12. e3296893. doi: 10.1155/2018/3296893. Erişim Adresi: [\[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5896350/pdf/BMRI2018-3296893.pdf\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5896350/pdf/BMRI2018-3296893.pdf). Erişim Tarihi: 31/12/2018.

RITT JF, RAYMOND F, LEPROHON P, LEGARE D, CORBEIL J, OUELLETTE M (2013). Gene amplification and point mutations in pyrimidine metabolic genes in 5-fluorouracil resistant *Leishmania infantum*. *PLoS Negl. Trop. Dis* [Electronic Journal], **7(11)**: 1-11. e2564. doi: 10.1371/journal.pntd.0002564. Erişim Adresi: [\[https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0002564&type=printable\]](https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0002564&type=printable). Erişim Tarihi: 31/12/2018.

ROGERS MB, HILLEY JD, DICKENS NJ, WILKES J, BATES PA, DEPLEDGE DP, HARRIS D, HER Y, HERZYK P, IMAMURA H, OTTO TD, SANDERS M, SEEGER K, DUJARDIN JC, BERRIMAN M, SMITH DF, HERTZ-FOWLER C, MOTTRAM JC (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*, *Genome Res*, **21(12)**: 2129–2142. doi: 10.1101/gr.122945.111. Epub 2011 Oct 28.

ROSS R (1903). Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *British medical journal*, **2**: 1261.

RUSSELL A (1756). The Natural History of Aleppo, and Parts Adjacent. Containing a Description of The City, and The Principal Natural Productions in its Neighbourhood; Together with an Account of The Climate, Inhabitants, and Diseases; Particularly of The Plague, with The Methods Used by The Europeans For Their Preservation. Printed for A. Millar, MDCCCLVI [i.e. 1756], London. Erişim Adresi: [\[https://doi.org/10.5962/bhl.title.36635\]](https://doi.org/10.5962/bhl.title.36635). Erişim Tarihi: 09/12/2018.

SAĞLIK BAKANLIĞI (2004). Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans Ve Laboratuvar Rehberi. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Erişim Adresi: [\[http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurveLabReh.pdf\]](http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurveLabReh.pdf). Erişim Tarihi: 18/12/2013.

SANCHEZ-CANETE MP, CARVALHO L, PEREZ-VICTORIA FJ, GAMARRO F, CASTANYS S (2009). Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**: 1305–1313.

- SINHA S, SUNDARAM S, SINGH AP, TRIPATHI A (2011). A gp63 based vaccine candidate against Visceral Leishmaniasis. *Bioinformation*, **5(8)**: 320-325.
- TEMEL SAĞLIK HİZMETLERİ GENEL MÜDÜRLÜĞÜ (2003), 24/10/2003 tarih ve 16130 sayılı Kutanöz Leyişmanyaz Genelgesi (2003/126).
- TriTrypDB (The Kinetoplastid Genomics Resource, 2018). Erişim Adresi: [<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>]. Erişim Tarihi: 05/12/2018.
- TOZ SO, NASEREDDIN A, OZBEL Y, ERTABAKLAR H, CULHA G, SEVİL N, ZIYA ALKAN M, JAFFE CL (2009). Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of Leishmania from human and canine clinical samples. *Trop Med Int Health*, **14(11)**: 1401-1406. doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02384.x.
- THSK (TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU) (2014). Erişim Adresi: [<http://www.thsk.gov.tr/>]. Erişim Tarihi: 10/04/2014.
- WORTMANN G, HOCHBERG L, HOUNG HH, SWEENEY C, ZAPOR M, ARONSON N, WEINA P, OCKENHOUSE CF (2005). Rapid identification of Leishmania complexes by a real-time PCR assay. *Am J Trop Med Hyg*, **73(6)**: 999-1004.
- UBEDA JM, LEGARE D, RAYMOND F, OUAMEU, AA, BOISVERT S, RIGAULT P, CORBEIL J, TREMBLAY MJ, OLIVIER M, PAPADOPOULOU B, OUELLETTE M (2008). Modulation of gene expression in drug resistant Leishmania is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome Biol* [Electronic Journal], **9(7)**: 1-16. R115. doi: 10.1186/gb-2008-9-7-r115. Erişim Adresi: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2530873/pdf/gb-2008-9-7-r115.pdf>]. Erişim Tarihi: 31/12/2018.
- UMS (ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI BULAŞICI HASTALIKLAR LABORATUVAR TANI REHBERİ) (2015a). Parazitoloji / Mikrobiyolojik Tanımlama / P-MT-04 / Sürüm: 1.1 / 01.01.2015 EDİTÖR: Efsun AKBAŞ, YARDIMCI EDİTÖRLER: Hakan ABACIOĞLU, Selin NAR ÖTGÜN, ANKARA – 2014, ISBN: 978-975-590-489-4, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934. Erişim Adresi: [<http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tani-rehberi/parazitoloji/UMS-P-MT-04-Kala-azar.pdf>]. Erişim Tarihi: 01/01/2015.
- UMS (ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI BULAŞICI HASTALIKLAR LABORATUVAR TANI REHBERİ) (2015b)-Parazitoloji / Mikrobiyolojik Tanımlama / P-MT-05 / Sürüm: 1.1 / 01.01.2015 EDİTÖR: Efsun AKBAŞ, YARDIMCI EDİTÖRLER: Hakan ABACIOĞLU, Selin NAR ÖTGÜN, ANKARA – 2014, ISBN: 978-975-590-489-4, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934. Erişim Adresi: [<http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tani-rehberi/parazitoloji/UMS-P-MT-05-Sark-cibani.pdf>]. Erişim Tarihi: 01/01/2015.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) (2010). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March. Erişim Adresi: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf]. Erişim Tarihi: 10/12/2018.
- WHO (2015). http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0008/239426/OUTLINING-A-STRATEGIC-FRAMEWORK-ON-LEISHMANIASIS-CONTROL.pdf?ua=1 (Erişim tarihi: 30.02.2015).
- WHO (2018a). Recognizing neglected tropical diseases through changes on the skin: a training guide for front-line health workers. Geneva: World Health Organization. Erişim Adresi: [<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272723/9789241513531-eng.pdf?ua=1>]. Erişim Tarihi: 19/11/2018.

WHO (2018b). Erişim Adresi:

[\[http://www.who.int/leishmaniasis/resources/REH_38_TABLEAU_S1_S2_Version_finale.pdf?ua=1\]](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/REH_38_TABLEAU_S1_S2_Version_finale.pdf?ua=1).

Erişim Tarihi: 10/12/2018.

YARDLEY V, CROFT SL, DE DONCKER S, DUJARDIN JC, KOIRALA S, RIJAL S, MIRANDA C, LLANOS-CUENTAS A, CHAPPUIS F (2005). The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**: 272–275.

ZHANG WW, MATLASHEWSKI G (2012). Deletion of an ATP-binding cassette protein subfamily C transporter in *Leishmania donovani* results in increased virulence. *Mol Biochem Parasitol*, **185(2)**: 165-169. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.07.006. Epub 2012 Jul 27.



ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Dilek

Soyadı: Güldemir

Doğum yeri ve tarihi: Gerede, 25/05/1973

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü (HSGM), Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı (MRLBÜDB), Ulusal Parazitoloji Referans Laboratuvarı, Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No:55, Refik Saydam Yerleşkesi, E Blok, Zemin Kat, 06100. Sıhhiye, ANKARA.

II. Eğitimi

2003-2008: Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı (RSHMB) Tıbbi Mikrobiyoloji, Tıpta Uzmanlık (TUT'a göre)

1990-1995: Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yabancı dili: İngilizce

III. Ünvanları

1995: Biyolog

2008: Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanı

2018: Tıbbi Mikrobiyoloji Doçenti

IV. Mesleki Deneyimi

2003-2008: RSHMB, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü

2008-2018: HSGM, MRLBÜDB

V. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Klinik Mikrobiyoloji Uzmanları Derneği-Moleküler Mikrobiyoloji Çalışma Grubu, Üye, 2017

ESCMID Study Group for Genomic and Molecular Diagnostics (ESGMD), Üye, 2016

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Üye, 2013

Klinik Mikrobiyoloji Uzmanları Derneği, Üye, 2009

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, Üye, 2003

Ankara Mikrobiyoloji Derneği, Üye, 2003

VI. Bilimsel İlgi Alanları

A) SCI/SCIE/ISI İndexine Kayıtlı Dergilerde Yayımlanan Yayınlar

- 1) **Güldemir D**, Turan M, Bakkaloğlu Z, Nar Ötgün S, Durmaz R. Optimization of real-time multiplex polymerase chain reaction for the diagnosis of acute bacterial meningitis and Neisseria meningitidis serogrouping. Mikrobiyol Bul. 2018 Jul;52(3):221-232. doi: 10.5578/mb.67019.
- 2) Kalcioğlu MT, **Güldemir D**, Ünaldı Ö, Egilmez OK, Çelebi B, Durmaz R. Metagenomics Analysis of Bacterial Population of Tympanosclerotic Plaques and Cholesteatomas. Otolaryngol Head Neck Surg. 2018 Oct;159(4):724-732. doi: 10.1177/0194599818772039. Epub 2018 Apr 24.
- 3) Cosgun Y, **Güldemir D**, Coskun A, Yolbakan S, Kalaycıoğlu AT, Korukluoğlu G, Durmaz R. The importance of serological and molecular analyses for the diagnosis of measles cases and for meeting elimination targets in Turkey from 2007 to 2015. Epidemiol Infect. 2018 Apr;146(6):735-740. doi: 10.1017/S0950268818000432. Epub 2018 Mar 14.
- 4) İpek MS, Ozbek E, **Güldemir D**, Akpolat N. Neonatal Meningitis Caused by

Actinomyces: A Case Report of the Most Probably New Strain. J Pediatr Infect Dis. 12(2), 138-141., Doi: 10.1055/s-0037-1598182.

- 5) Kalaycioglu AT, Yolbakan S, **Guldemir D**, Korukluoglu G, Coskun A, Cosgun Y, Durmaz R. Towards measles elimination: Phylogenetic analysis of measles viruses in Turkey (2012-2013) and identification of genotype D8. J Med Virol. 2016 Nov;88(11):1867-73. doi: 10.1002/jmv.24548. Epub 2016 Apr 26.
- 6) **Guldemir D**, Acar S, Otgun SN, Unaldi O, Gozalan A, Ertek M, Durmaz R. Invasive Pneumococcal Diseases Study Group. High-level Genetic Diversity among Invasive Streptococcus pneumoniae Isolates in Turkey. Jpn J Infect Dis. 2015 Aug 7. [Epub ahead of print]; doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.062
- 7) Tezer H, Ozkaya-Parlakay A, Kanik-Yukse S, Gülhan B, **Guldemir D**. A Syrian patient diagnosed with meningococcal meningitis serogroup B. Hum Vaccin Immunother. 2014 May 1;10(8). [Epub ahead of print]
- 8) Feyzioğlu B, **Guldemir D**, Karagöz A, Erayman İ, Demircili M.E, Baykan M. Rapid Dissemination of Multidrug Resistant *Providencia Stuartii*- A University Hospital Based Study. Biomedical Research 2014; 25 (1): 104-109.
- 9) Kalaycioglu AT, Baykal A, **Guldemir D**, Bakkaloglu Z, Korukluoglu G, Coskun A, Torunoglu MA, Ertek M, Durmaz R. Molecular characterization of measles viruses in Turkey (2010-2011): First report of genotype D9 involved in an outbreak in 2011. J Med Virol. 2013 Aug 19. 85:2128-35.
- 10) **Guldemir D.**, Kalaycioglu A.T., Altas AB, Korukluoglu G., Durmaz R. Monitoring Genetic Diversity of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Circulating during the Post-Pandemic Period in Turkey. Jpn. J. Infect. Dis. 2013 Jul; 66, 299-305.
- 11) Coskun-Ari FF, **Guldemir D.**, Durmaz R. One-step multiplex PCR assay for detecting Streptococcus pneumoniae serogroups/types covered by 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13). PLoS One. 2012;7(12):e50406. doi: 10.1371/journal.pone.0050406. Epub 2012 Dec 4. **Alıntılanma Sayısı: 2**
- 12) Kalaycıoğlu A.T., Durmaz R., **Guldemir D.**, Korukluoğlu G., Ertek M.

Türkiye'deki Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüslerinin Kısmi M-segmentlerinin Genetik Analizi. Kafkas Univ Vet Fak Derg.19 (Suppl-A): A147-A152, 2013; DOI: 10.9775/kvfd.2012.8203.

13) **Güldemir D.**, Akbaş E., Ötgün S.N., Tekin A., Esen B. Boğmacanın Moleküler Tanısı İçin Laboratuvar Yapımı Bir PCR Yönteminin Geliştirilmesi ve Optimizasyonu. Mikrobiyol Bul 2011; 45(4): 632-645. **Alıntılanma Sayısı: 1**

14) Ertek M, Durmaz R, **Güldemir D.**, Altas AB, Albayrak N, Korukluoglu G. Epidemiological, demographic, and molecular characteristics of laboratory-confirmed pandemic influenza A (H1N1) virus infection in Turkey, May 15-November 30, 2009. Jpn J Infect Dis. 2010 Jul;63(4):239-45. **Alıntılanma sayısı:8**

B) Diğer Indexlere Kayıtlı / Hakemli Dergilerde Yayımlanan Yayınlar

- 1) **Güldemir D (2018)**. Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında ortam kontrolü nasıl yapılır? Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 75(2), Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.83713.
- 2) Dal T., Celen M.K., Ayaz C., Kalkanli S., Nida Özcan N., Genisel N., **Güldemir D.** Are We Prepared to Future Flu Pandemics? Experiences in Hospitalized Patients With 2009 H1N1/A Influenza. EC Microbiology 1.2 (2015): 64-69.
- 3) Güldemir D, Karagöz A, Dal T, Tekin A, Özekinci T, Durmaz R. Hastane kaynaklı enterokok izolatlarının pulsed-field jel elektroforezis yöntemiyle moleküler tiplendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(1): 1-10.
- 4) Karagöz A, **Güldemir D**, Durmaz R. *Providencia stuartii* moleküler tiplemesi için pulsed-field jel elektroforezinin optimizasyonu Dicle Med J. 2013; 40 (3): 436-440. doi: 10.5798/diclemedj.0921.2013.03.0305

C). Indexlere Kayıtlı / Hakemli Konferans Kitaplarında Yayımlanan Bildiriler

- 1) **Güldemir Dilek**, Nalbantoğlu Ayşe Serpil (2018). First Comparison Report of The Genetic Based Polymorphism in Leishmania infantum Genome Sequences of Turkish Strain and Reference Leishmania infantum JPCM5 Strain. 2nd International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB), Podgorica, Karadağ, 26-30 Haziran 2018, S-478, p:13.
- 2) **Güldemir Dilek**, Nalbantoğlu Ayşe Serpil (2018). Leishmania infantum- Whole Genome Sequencing: The First Study Since The Reference Genome 2nd International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB), Podgorica, Karadağ, 26-30 Haziran 2018, S-479, p:14.
- 3) **Güldemir Dilek** (2018). Tıbbi Laboratuvarlarda ISO 15189 Standardına Dayalı Kalite Yönetim Sistemi Gerekli mi? 12. Uluslararası Sağlık Hizmetlerinde Kalite, Akreditasyon ve Hasta Güvenliği Kongresi, Belek-Antalya/Türkiye, 25-28 Nisan 2018, Sözlü Bildiri.
- 4) A.T. Kalaycıoğlu, D. Güldemir, S. Yolbakan, G. Korukluoğlu, Y. Cosgun, A. Coşkun, R. Durmaz. Towards Measles Elimination: Phylogenetic Analysis of Measles Viruses (2011-2015) In Turkey. 10. Balkan Mikrobiyoloji Kongresi (Microbiologia Balkanica'2017) Sofya-Bulgaristan, 16-18 Kasım 2017, V-6, p:234.
- 5) M. T. Kalcıoğlu, **D. Güldemir**, O. Unaldi, O. K. Egilmez, B. Celebi, R. Durmaz. Overview of the Microbiology of Tympanosclerotic Plaque and Cholesteatoma in the Light of Metagenomics Research. 10. Balkan Mikrobiyoloji Kongresi (Microbiologia Balkanica'2017) Sofya-Bulgaristan, 16-18 Kasım 2017, MM-29, p:43.
- 6) M. Tayyar Kalcıoğlu, **Dilek Güldemir**, Özlem Ünaldi, Oguz Kadir Eğilmez, Bekir Çelebi, Rıza Durmaz. Timpanosklerotik Plak ve Kolesteatom Mikrobiyotası: Metagenomiks Analiz. 39. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, Belek-Antalya/Türkiye, 8-12 Kasım 2017, SB-140.

- 7) **Dilek Güldemir**, Fatma Filiz Arı, Ali Rıza Aktas, Selin Nar Ötgün, Rıza Durmaz. Klinik Örneklerde Gerçek Zamanlı Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemiyle Akut Bakteriyel Menenjit Tanısı. 4. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Kemer-Antalya/Türkiye, 08-12 Kasım 2017, SS-13, s:166.
- 8) **Dilek Guldemir**, Fatma Filiz Ari, Ayse Basak Altas, Zekiye Bakkaloglu, Özlem Ünalı, Fatma Bayraktar, Gulay Korukluoglu , Ali Riza Aktas, Riza Durmaz. Comparison of amino acid alterations in HA1 and HA2 domains of the HA gene of pandemic and post-pandemic influenza A(H1N1)pdm09 isolates in Turkey. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Vienna-Austria, 22-25 April 2017, p1422.
- 9) **Dilek Güldemir**, Ayşe Başak Altaş, Fatma Filiz Arı, Zekiye Bakkaloğlu, Özlem Ünalı, Fatma Bayraktar, Gülay Korukluoğlu, Ali Rıza Aktaş, Rıza Durmaz. Türkiye’de 2015-2016 İnfluenza Sezonunda Görülen İnfluenza A(H1n1)Pdm09 Virüsünün Moleküler Karakterizasyonu. XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Belek-Antalya/Türkiye, 16-20 Kasım 2016, SS-21, s: 190.
- 10) Zekiye Bakkaloğlu, Selin Nar Ötgün, Dilek Güldemir, Meral Turan, Rıza Durmaz. Neisseria Meningitidis Serogrup B Aşı Antijenlerinin Genetik Analizi: Menb Aşları Türkiye İzolatlarını Kapsıyor Mu? XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Belek-Antalya/Türkiye, 16-20 Kasım 2016, SS-29, s:196
- 11) Kalcıoğlu M.T., **Güldemir D.**, Çelebi B., Kılıç S., Eğilmez O.K., Durmaz R. Kolesteatoma ve Timpanosklerotik Plaklarda Bakterilerin Rolünün 16S rRNA PCR ve DNA Dizi Analizi ile Araştırılması. 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Belek-Antalya/Türkiye, 18-22 Kasım 2015, SS29, s: 147-148.
- 12) Güldemir D., Turan M., Bakkaloğlu Z., Ötgün S.N., Durmaz R. *Neisseria meningitidis* Suşlarında Serogrup Dağılımı: Serogrup B Dominansı. 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Belek-Antalya/Türkiye, 18-22 Kasım 2015, PS004, s:162.
- 13) Karabıçak N., **Güldemir D.**, Durmaz R. Flukonazole Dirençli/Duyarlılığı

Azalmış İnvazif *Candida albicans* İzolatlarında *Erg11* Gen Mutasyonlarının DNA Dizi Analizi Yöntemi ile Araştırılması. 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Belek-Antalya/Türkiye, 18-22 Kasım 2015, PS302, s:314.

- 14) Yumuşak D., **Güldemir D.**, Durmaz R. Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu Suşlarının Yeniden İsimlendirme Çalışması. 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Belek-Antalya/Türkiye, 18-22 Kasım 2015, PS346, s:338.
- 15) Coşgun Y., **Güldemir D.**, Yolbakan S., Kalaycıoğlu A.T, Coşkun A., Kalaycıoğlu A, Durmaz R. Ülkemizde 2006-2014 yılları arasında dolaşımda bulunan kızamık virüslerinin izlenmesi. XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Belek-Antalya/Türkiye, 12-16 Kasım 2014, SS:12, s:399-400.
- 16) **Güldemir D.**, Turan M., Bakkaloğlu Z., Ötgün S.N., Durmaz R. Klinik örneklerde gerçek zamanlı mültepleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle meningokokkal menenjit tanısı. XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Belek-Antalya/Türkiye, 12-16 Kasım 2014, SS:17, s: 406.
- 17) **Güldemir D.**, Karagöz A., Durmaz R. *Corynebacterium* türlerinin moleküler tiplmesi için pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) yönteminin optimizasyonu. XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Belek-Antalya/Türkiye, 12-16 Kasım 2014, PS:286, s:327-328.
- 18) **Güldemir D.**, Karagöz A., Durmaz R. *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* 'in moleküler tiplmesi için pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) yönteminin optimizasyonu. XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Belek-Antalya/Türkiye, 12-16 Kasım 2014, PS:287, s:328.
- 19) Nevşehir, Ahmet Arslantürk: 26
- 20) Kalaycıoğlu A.T, Yolbakan S., **Güldemir D.**, Korukluoğlu G., Coşkun A., Coşgun Y., Torunoğlu, Durmaz R. Türkiye'de 2012-2013 yılları salgın sürecinde kızamık virüslerinin moleküler analizi: Genotip D8 virüslerinin ülkemizde ilk kez görülmesi. 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara-Türkiye, 4-7 Haziran 2014, OP-001, s: 86.
- 21) **Güldemir D.**, Karagöz A., Dal T., Tekin A., Durmaz R. Enrerokok suşlarının

- pulsed-field jel elektroforezi yöntemiyle moleküler tiplendirilmesi. 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara-Türkiye, 4-7 Haziran 2014, PP 008, s: 93.
- 22) Hazırolan G., Güldemir D., Aksu N., Baran I., Mumcuoğlu İ., Bayık S.A., Karagöz A., Durmaz R. Vankomisine dirençli enterokok suşlarının klonal analizinde Rep-PCR Diversilab ile pulsed-field jel elektroforezi yönteminin karşılaştırılması. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara-Türkiye, 4-7 Haziran 2014, PP 018, s: 96.
- 23) Özkan Ş., Güldemir D., Karagöz A., Durmaz R. *Acinetobacter baumannii* suşlarının pulsed field jel elektroforezi (PFGE) ile tiplendirilmesi. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara-Türkiye, 4-7 Haziran 2014, PP 034, s: 103.
- 24) Karabicak N, **Güldemir D.**, Topal S., Alem N., Danışmaz O., Elcin G., Durmaz R. Comparative evaluation of dermatophyte-PCR kit with conventional methods for rapid detection of dermatophytes and identification of *Trichophyton rubrum* in nail specimens. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona-Spain, 10-13 May 2014, eP391.
- 25) Aslınur Özkaya-Parlakay A., Tezer H., Kanık- Yüksek S., Gülhan B., **Güldemir D.**, Durmaz R. Meningokokal Menenjit Tip B Tanısı Alan Suriyeli Bir Hasta. İnfeksiyon Dünyası Çalıştayı, Ankara-Türkiye, 20-23 Mart 2014, S-17, s:19.
- 26) **Güldemir D.**, Durmaz R., Oğun S.N., Acar S., Gozalan A., Ertek M. Genetic analysis of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates indicates high levels of diversity in Turkey. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin-Germany, 27-30 April 2013, eP731.
- 27) Ötügen S.N., Durmaz R., Gözalan A., Acar B., **Güldemir D.**, Ertek M. Konjuge aşının invaziv *Streptococcus pneumoniae* suşlarının serotip dağılımı ve antibiyotik duyarlılıklarına etkisinin araştırılması. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Aydın-Türkiye, 3-7 Kasım 2012, P328, s:372.

- 28) Arı F.F., Durmaz R., **Güldemir D.**, Ötgün S.N., Acar B., Ertek M. Tek-aşamalı multipleks PCR ile 13-valanlı aşı kapsamındaki *Streptococcus pneumoniae* serotiplerinin hızlı tanısı. 7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara-Türkiye, 5-8 Haziran 2012, OP-05, s: 198.
- 29) Kalaycıoğlu A.T., Baykal A., **Güldemir D.**, Coşkun A., Bakkaloğlu Z., Korukluoğlu G., Ertek M., Durmaz R. Türkiye’de 2011 yılında tespit edilen kızamık viruslarının genetik analizi: Genotip D9 viruslarının ülkemizde ilk kez görülmesi. 7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara-Türkiye, 5-8 Haziran 2012, OP-08, s: 202.
- 30) Ünaldı Ö., Acar S., Ötgün S.N., **Güldemir D.**, Gözalan A., Ertek M., Durmaz R. Türkiye’deki invaziv *Streptococcus pneumoniae* enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisi. 7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara-Türkiye, 5-8 Haziran 2012, PP-029, s: 245.
- 31) Arı F.F., Çiçek A.Ç., Çizmeci Z., **Güldemir D.**, Balcı P.Ö., Durmaz R. Vankomisine dirençli Enterokoklarda tür ve direnç genlerinin (*vanA*, *vanB* ve *vanC-1*) multipleks PCR yöntemi ile saptanması. 7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara-Türkiye, 5-8 Haziran 2012, PP-037, s: 255.
- 32) **Güldemir D.**, Akbaş E., Ötgün S.N., Tekin A., Esen B. Boğmaca tanısında in-house polimeraz zincir reaksiyonunun geliştirilmesi ve optimizasyonu. I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya-Türkiye, 2011, PP: 282.
- 33) **Güldemir D.**, Kalaycıoğlu A., Durmaz R., Altaş A.B. Korukluoğlu G., Ertek M. Türkiye’de 2010-2011 İnfluenza Sezonunda Görülen Pandemik İnfluenza A (H1N1) Virüsünün Moleküler Karakterizasyonu I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya-Türkiye, 2011, PP: 318
- 34) Durmaz R., Acar S., Ünaldı Ö., Arı F.F., Ötgün S.N., **Güldemir D.**, Gözalan A., Ertek M. Molecular Epidemiology of Invasive *Streptococcus pneumoniae* in Turkey. European Biotechnology Congress 2011, Istanbul-Turkey, 2011, s:114.
- 35) Arı F.F., Durmaz R., **Güldemir D.**, Ötgün S.N. Acar B., Ertek M. One-Step

Multiplex PCR for rapid identification of 13- valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV-13) serotypes. European Biotechnology Congress 2011, Istanbul-Turkey, 2011, s:108.

- 36) Otgun S.N., Durmaz R., Gozalan A., **Guldemir D.**, Acar B., Ertek M. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from the children with pneumococcal infections in Turkey. The 4th Eurasia Congress of Infectious Diseases, Sarajevo-Bosnia&Herzegovina, 1-5 June 2011, 093, p:200.
- 37) Turan M., Levent B., Kayali R., **Guldemir D.**, Esen B. "Evaluation of patients with *Clostridium difficile* associated diarrhea" Second International *Clostridium difficile* Symposium Abstract Books, Maribor, Slovenia, 6-9 June 2007, P2, s:52.
- 38) Kayali R., Bayrak H., **Guldemir D.**, Levent B., Esen B. 2004-2006 yıllarında dışkı kültürlerinden izole edilen *Campylobacter* türlerinin değerlendirilmesi. V. Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu Program ve Özet Kitabı, Samsun, Türkiye, 7-10 Nisan 2007, P10, s:107.
- 39) Kayali R., Bayrak H., Levent B., **Guldemir D.**, Esen B. 2006 yılında incelenen *Salmonella* ve *Shigella* suşları ile antimikrobiyal duyarlılıkların değerlendirilmesi" V. Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu Program ve Özet Kitabı, Samsun, Türkiye, 7-10 Nisan 2007, P11, s:108.
- 40) Karaca Y., Çöplü N., Gözalan A., Öncül Ö., **Guldemir D.**, Tezcan A., Esen B., Akın L. Sifiliz tanısında kullanılan TPHA, ELISA ve Western-Blot yöntemlerinin geçerliliği. III. Ulusal Chlamydia İnfeksiyonları Simpozyumu Program ve Özet Kitabı, Afyon, Türkiye, 26-29 Nisan 2006, P2, s:166.
- 41) Levent B., Yasar E., Kayali R., **Guldemir D.**, Tekin A.C, Esen B. "Analysis of Salmonella Typhi strains isolated from blood samples of pediatric patients" XXIII. World Congress of Pathology and Laboratory Medicine Abstract Books, Istanbul, Turkey, 26-30 May 2005, P3-133. p:289.
- 42) Kayalı R., Levent B., **Guldemir D.**, Esen B. 2003-2004 yıllarında incelenen

dışkı örneklerinin değerlendirilmesi. IV. Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan Enfeksiyonlar Simpozyumu Program ve Özet Kitabı, Mersin, Türkiye, 16-20 Mayıs 2005, P-12, s:362.

43) **Güldemir D.**, Acar S., Otgün S.N., Ünalı Ö., Gozalan A., Ertek M., Durmaz R. İnvaziv *S. pneumoniae* izolatlarının serotip, MLST ve PFGE sonuçlarının karşılaştırılması. Sözlü Bildiri. II. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya-Türkiye, 2013, SS: 11

44) Karabıçak N., **Güldemir D.**, Topal S., Alem N., Danışmaz O., Elçin G., Durmaz R. Direkt tırnak örneklerinden PCR kiti ile *Trichopyton rubrum* ve diğer dermatofitlere bağlı gelişen onikomikozların hızlı tanısı. II. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya-Türkiye, 2013, PS337.

C) Kitap Bölüm Çevirisi

1) Koneman's Color Atlas And Textbook of Diagnostic Microbiology Türkçe Baskısı, Koneman Renkli Atlas ve Tanısal Mikrobiyoloji Kitabı, Çeviri Editörleri: Prof.Dr. Ahmet Başustaoğlu, Prof.Dr. Ayşe Dürdal Us, Ankara-2017. Görsel Kısım 12.1-13.1: Stafilokok ve İlişkili Türlerin Tanımlanması, Sayfa: 66-75.

2) Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı Cilt 1-2-3/Baş Editör: Lynne S. GARCIA Çeviri Baş Editörleri: Ahmet BAŞUSTAOĞLU-Şinasi Taner YILDIRAN, ANKARA-2014. BÖLÜM 7: PCR ile Solunum Yolu Örneklerinde Mycoplasma pneumoniae'nın saptanması, Sayfa: 12.2.3.47-59.

D) Kitap Yazarlığı

Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi Cilt 1,2,3/ EDİTÖR: Efsun AKBAŞ Yardımcı Editörler: Hakan ABACIOĞLU, Selin NAR ÖTGÜN, ANKARA – 2014, ISBN: 978-975-590-489-4. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934

VII. Bilimsel Etkinlikler

A) Proje Deneyimi

- 1) Kolesteatoma ve Timpanosklerotik Plak Oluşumunda Bakterilerin Rolü: DNA Dizi Analizine Dayalı Moleküler Araştırma (Proje Kodu: 3001, Proje No: 116S078), **Tübitak Projesi**, Araştırmacı: Güldemir Dilek, Yürütücü: Kalcioğlu Mahmut Tayyar, Araştırmacı: Ünalı Özlem, Aratırmacı: Çelebi Bekir, 01/06/2016-01/09/2017.
- 2) Karbapenem Dirençli Acinetobacter Baumannii Kan İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu: Multilocus Sequence Typing, Pulsotyping ve Direnç İlişkili Mutasyon Analizi (Proje Kodu: 3001, Proje No: 116S249), **Tübitak Projesi**, Araştırmacı: Güldemir Dilek, Yürütücü: Gözalan Ayşegül, Araştırmacı: Ünalı Özlem, Araştırmacı: Açıkgöz Ziyacibali, Araştırmacı: Köksal Fatma, Araştırmacı: Kuzucu Çiğdem, Araştırmacı: Aydoğan Sibel, 01/07/2017-19/10/2018.
- 3) İnvaziv İnfeksiyonlardan Sorumlu Streptococcus pneumoniae Suşlarının Serotip Antibiyotik Direnci ve Moleküler Tiplerinin Araştırılması / Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Koordinasyonunda Çok Merkezli Ulusal Proje, Diğer Kamu Kuruluşları (Yükseköğretim Kurumları hariç), Araştırmacı: **Güldemir Dilek**, Araştırmacı: Bakır Mustafa, Araştırmacı: Nar Ötgün Selin, Araştırmacı: Durmaz Rıza, Araştırmacı: Türkoğlu Salih, Araştırmacı: Ertek Mustafa, Yürütücü: Gözalan Ayşegül, Araştırmacı: Perçin Duygu, 28/09/2009 - 28/09/2012.
- 4) Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile Türkiye’den İzole Edilen Kutanöz Leishmaniosis Etkeni Leishmania Infantum’un Genom Dizisinin Çıkarılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: **Güldemir Dilek**, Yürütücü: Nalbantoğlu Ayşe Serpil, Araştırmacı: Usluca Selma, Araştırmacı: Bakkaloğlu Zekiye, 30/03/2017-18/12/2018.
- 5) Boğmaca’nın Laboratuvar Tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Analitik Duyarlılığının ve Analitik Özgüllüğünün Arttırılması, Diğer kamu kuruluşları (Yükseköğretim Kurumları hariç), Yürütücü: **Güldemir Dilek**,

Araştırmacı: Nar Ötgün Selin, Araştırmacı: Esen Berrin, Araştırmacı: Akbaş Efsun, 24/05/ 2007-24/04/2008.

- 6) DIPNET (Diphtheria Surveillance Network) DG SANCO **Avrupa Komisyonu SB Temel Sağlık Hizmetleri Genel M¼d¼rl¼ę¼ Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı İş Birliği** Üst Solunum Yolu Enfeksiyonu Semptomları Olan Olgularda Toksik Corynebacterium diphtheria ve Corynebacterium ulcerans Kolonizasyonunun Araştırılması (EU DG SANCO Agreement No 2005210) (Yardımcı araştırmacı olarak görev aldım).

B) Aldığı Ödüller

- 1) 11. Ulusal Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi-**Sözl¼ Bildiri Birincilik Öd¼lü**, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Derneği, 2018.
- 2) 39. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi-**Sözl¼ Bildiri Üç¼nc¼lük Öd¼lü**, Türk Kulak Burun Boğaz Baş Boyun Cerrahisi Derneği, 2017.
- 3) 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi-**En Başarılı Çalışma J¼ri Özel Öd¼lü**, Klinik Mikrobiyoloji Uzmanları Derneği, 2015.
- 4) **Patent teşvik öd¼lü**, TÜBİTAK, 2012.
- 5) 7. Ulusal Molek¼ler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi-**Sözl¼ Bildiri Birincilik Öd¼lü**, Hacettepe Üniversitesi, 2012.
- 6) I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi-**Poster Bildirisi İkincilik Öd¼lü**, Klinik Mikrobiyoloji Uzmanları Derneği, 2011.

VIII. Diğer Bilgiler

A) Eğitim Programı Haricinde Aldığı Kurslar Ve Katıldığı Eğitim Seminerleri

- 1) 12. Uluslararası Sağlık Hizmetlerinde Kalite, Akreditasyon ve Hasta Güvenliği Kongresi, Antalya. 25.04.2018-28.04.2018 (Uluslararası)
- 2) 4. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Belek/ANTALYA. 08.11.2017-12.11.2017 (Ulusal)
- 3) 7. Ulusal Aşı Sempozyumu, Sempozyum Katılımı, ANKARA. 20.09.2017-24.09.2017 (Ulusal)
- 4) 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), VIENNA. 22.04.2017-25.04.2017 (Uluslararası)
- 5) XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Belek-ANTALYA. 16.11.2016-20.11.2016 (Ulusal)
- 6) Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Belek-ANTALYA. 18.11.2015-22.11.2015 (Ulusal)
- 7) ISO 15189 İç Tetkik Eğitimi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, “ISO 15189 İç Tetkik Eğitimi” katılımı, ANKARA. 04.02.2015-04.02.2015 (Ulusal)
- 8) XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Belek-ANTALYA. 12.11.2014-16.11.2014 (Ulusal)
- 9) Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvara Dayalı Sürveyansı Sempozyumu, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı, “Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvara Dayalı Sürveyansı Sempozyumu” katılımı, NEVŞEHİR. 18.09.2014-19.09.2014 (Ulusal)
- 10) Tıbbi Önemi Olan Fungal Etkenlerin Tanımlanması Uygulamalı Eğitimi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, “Tıbbi Önemi Olan Fungal Etkenlerin Tanımlanması Uygulamalı Eğitimi” katılımı, ANKARA. 09.06.2014-13.06.2014 (Ulusal)

- 11) EUCAST Standartları Eğitimi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi, “EUCAST Standartları Eğitimi” katılımı, ANKARA. 09.06.2014-10.06.2014 (Ulusal)
- 12) 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, ANKARA. 04.06.2014-07.06.2014 (Ulusal)
- 13) Çalışan Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, “Çalışan Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi” katılımı, ANKARA. 28.04.2014-30.04.2014 (Ulusal)
- 14) ISO 15189 İç Kalite Kontrol Ve Dış Kalite Değerlendirme Eğitimi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, “ISO 15189 İç Kalite Kontrol Ve Dış Kalite Değerlendirme Eğitimi” katılımı, ANKARA. 21.04.2014-22.04.2014 (Ulusal)
- 15) Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı Projesi Ulusal Toplantısı ve II. Saha Epidemiyolojisi Konferansı, Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolü Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi kapsamında, “Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı Projesi Ulusal Toplantısı ve II. Saha Epidemiyolojisi Konferansı” katılımı, ANKARA. 15.04.2014-17.04.2014 (Ulusal)
- 16) Dış Kalite Değerlendirme Örneklerinin Hazırlanması Uygulamalı Eğitimi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Bulaşıcı hastalıklar Kontrol Programları Başkan Yardımcılığı, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, “Dış Kalite Değerlendirme Örneklerinin Hazırlanması Uygulamalı Eğitimi” katılımı, ANKARA. 01.04.2014-04.04.2014 (Ulusal)
- 17) II. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, ANTALYA. 10.11.2013-13.11.2013 (Ulusal)
- 18) 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), BERLİN. 27.04.2013-30.04.2013 (Uluslararası)
- 19) ISO 15189 Farkındalık Temel ve Spesifik Eğitimleri, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, “ISO 15189 Farkındalık Temel ve Spesifik

- Egitimleri” katılımı, ANKARA. 15.10.2012-16.10.2012 (Ulusal)
- 20) Türkiye’de Ulusal Laboratuvara Dayalı Anti Tüberküloz İlaç Direnci Sürveyansı Uygulamalı Eğitimi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, “Türkiye’de Ulusal Laboratuvara Dayalı Anti Tüberküloz İlaç Direnci Sürveyansı Uygulamalı Eğitimi” katılımı, ANKARA. 11.06.2012-15.06.2012 (Ulusal)
- 21) Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvar Hizmetleri ile İlgili Mevzuat ve Gelişmeler, Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği (KLİMUD), “Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvar Hizmetleri ile İlgili Mevzuat ve Gelişmeler” başlıklı toplantı katılımı, ANKARA. 23.02.2012-23.02.2012 (Ulusal)
- 22) I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, ANTALYA. 12.11.2011-16.11.2011 (Ulusal)
- 23) European Biotechnology Congress 2011, ISTANBUL. 28.09.2011-01.10.2011 (Uluslararası)
- 24) III. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu, ANKARA. 01.11.2010-02.11.2010 (Ulusal)
- 25) I. Ulusal HPV ve Kanser Sempozyumu, ANKARA. 30.04.2010-30.04.2010 (Ulusal)
- 26) Laboratuvar Güvenliği Temel Uyum Eğitimi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Laboratuvar Güvenliği Temel Uyum Eğitimi, ANKARA. 01.03.2010-01.03.2010 (Ulusal)
- 27) Klinik (Tıbbi) Mikrobiyoloji Uzmanlığı ve Laboratuvar Uygulamaları Sempozyumu, Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği (KLİMUD) “Klinik (Tıbbi) Mikrobiyoloji Uzmanlığı ve Laboratuvar Uygulamaları Sempozyumu” katılımı, ANKARA. 23.10.2009-24.10.2009 (Ulusal)
- 28) Spesifik Laboratuvar Eğitimleri-Parazitoloji Modülü, Türkiye’de Bulasıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolü Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi TR0503.13 kapsamında “Parazitoloji Modülü” katılımı, ANKARA. 12.01.2009-16.01.2009 (Ulusal)

- 29) Temel Laboratuvar Yönetimi Eğitimi, Türkiye’de Bulasıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolü Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi kapsamında “Temel Laboratuvar Yönetimi Eğitimi”, ANKARA. 03.03.2008-05.03.2008 (Uluslararası)
- 30) III. Ulusal Chlamydia Enfeksiyonları Simpozyumu, AFYON. 26.04.2006-29.04.2006 (Ulusal)

B) Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

- 1) XI. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu / **Eğitimci olarak**, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 05.09.2016-8.09.2016 (Ulusal)
- 2) X. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu / **Eğitimci olarak**, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 01.06.2015-04.06.2015 (Ulusal)
- 3) IX. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu / **Eğitimci olarak**, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 23.06.2014-27.06.2014 (Ulusal)
- 4) VIII: Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu / **Eğitimci olarak**, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 24.06.2013-28.06.2013 (Ulusal)
- 5) VII. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu / **Eğitimci olarak**, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 15.10.2012-9.10.2012 (Ulusal)
- 6) VI. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu / **Eğitimci olarak**, T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, 10.10.2011-14.10.2011 (Ulusal)
- 7) V. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu / **Eğitimci olarak**, T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, 13.10.2010-17.10.2010 (Ulusal)
- 8) Spesifik Laboratuvar Eğitimleri / Difteri-Bogmaca Modülü-**Eğitimci olarak**, Türkiye’de Bulasıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolü Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi (TR0503.13) kapsamında “Difteri-

Bogmaca Modülü-Uygulamalı Eğitim, T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, 22.12.2008-26.12.2008 (Ulusal)

- 9) Spesifik Laboratuvar Eğitimleri / Gıda ve Su Kaynaklı Enfeksiyon Etkenleri Modülü-**Eğitimci olarak**, Türkiye’de Bulasıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolü Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi-Faz II (TR0503.13) kapsamında “Gıda ve Su Kaynaklı Enfeksiyon Etkenleri Modülü-Uygulamalı Eğitimi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, 07.07.2008-11.07.2008 (Ulusal)
- 10) Enfeksiyon Dünyası Çalıştayı, Çalıştay Katılımı, ANKARA. 22.03.2018-25.03.2018 (Ulusal)
- 11) Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Çalıştayı / **Test Prosedürleri Çalışma Grubu Üyesi**, Türkiye’de Bulasıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyans Sisteminin Güçlendirilmesi ve Kontrolü Projesi III (TR0802.16) kapsamında” Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Çalıştayı” nda” Test Prosedürleri Çalışma Grubu Üyesi” olarak standardın yazılmasına katkı sağlanması, ANKARA. 16.12.2013-20.12.2013 (Ulusal)
- 12) Kısa Eğitim Kurslarının Tasarımı, Uygulaması ve Değerlendirilmesi Çalıştayı, Türkiye’de Bulasıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyans Sisteminin Güçlendirilmesi ve Kontrolü Projesi III (TR0802.16) kapsamında “Kısa Eğitim Kurslarının Tasarımı, Uygulaması ve Değerlendirilmesi Çalıştayı” katılımı, ANKARA 20.02.2013-22.02.2013 (Ulusal)
- 13) CCH Fever Workshop “Crieman Congo Hemorrhagic Fever Modern Approaches to Diagnostics, Surveillance, Prevention, Therapy and Preparedness, KKKA hakkında düzenlenen uluslararası katılımlı çalıştay, ANKARA. 19.10.2011-19.11.2011 (Uluslararası)