



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TÜRKİYE'DE ETÇİ PİLİÇLERDEN İZOLE EDİLEN
FOWL AVIADENOVİRLERİN
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Tansu BİÇAKCIOĞLU

**VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK**

**ANKARA
2023**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE ETÇİ PİLİÇLERDEN İZOLE EDİLEN
FOWL AVIADENOVİRUSLARIN
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Tansu BIÇAKCIOĞLU

**VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
TDK-2022-2434 kodlu projesi ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Türkiye’de Etçi Piliçlerden İzole Edilen Fowl Aviadenovirusların Moleküler Epidemiyolojisinin Belirlenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımda yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Tansu BIÇAKCIOĞLU

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Anabilim Dalında
Tansu BIÇAKCIOĞLU tarafından hazırlanan
“Türkiye’de Etçi Piliçlerden İzole Edilen Fowl Aviadenovirusların Moleküler
Epidemiyolojisinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY
ÇOKLUĞU ile kabul / ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

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

İmza
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Türkiye’de Etçi Piliçlerden İzole Edilen Fowl Aviadenovirusların Moleküler Epidemiyolojisinin Belirlenmesi

Fowl Aviadenovirus’lar (FAdV), kanatlı hayvanları etkileyen adenoviruslar içerisinde bulunan ve etçi piliç yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan viral etkenlerdir. Vertikal ve horizontal olarak bulaşabilmeleri nedeniyle damızlık ve etçi piliç kümeslerinde FAdV kökenli hastalıkların kontrol altına alınmasında etkenlerin epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. FAdV’ler etçi piliçlerde %80’lere kadar ulaşabilen değişen mortalitelerde İnklüzyon Cisimcikli Hepatit (IBH), Hepatit Hidroperikardiyum Sendrom (HHS) ve Adenoviral Taşlık Erozyonu (AGE) hastalıklarına neden olmaktadır. FAdV’ler çoğunlukla genç yaştaki etçi piliçleri etkilemektedir. FAdV’lerin farklı coğrafik bölgelerde farklı genotiplerinin baskın olması nedeniyle koruma-kontrol programlarında genotip hedefli çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasında, Türkiye’de etçi piliç yetiştiriciliğinin yoğun olduğu bölgelerde dolaşımda olan FAdV saha serotiplerinin belirlenerek baskın genotiplerin ve moleküler epidemiyolojilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, damızlık aşı durumları, yaş ve bulaşma yolları gibi epidemiyolojik olarak önem arz eden parametreler göz önünde bulundurularak örneklemeler yapılmıştır. Karaciğer ve kloakal sıvay örneklerinden elde edilen viral DNA’lar, PCR yöntemi ile hekson loop-1 gen bölgesini hedef alan primerler kullanılarak FAdV teşhisi sağlanmıştır. Aşısız kümeslerin (20/40) %50’si aşılanmış kümeslerin ise (4/40) %10’u, toplamda ise iki yetiştirme döneminde kümeslerin %30’unun FAdV pozitif olduğu görülmüştür. FAdV yönünden pozitif çıkan kümeslerde dolaşımda olan serotiplerin belirlenmesi amacıyla hekson geni dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonucunda hem karaciğer hem de kloakal sıvaylardan teşhis edilen FAdV’lerin hepsinin FAdV-8b serotipi ile benzediği görülmüştür. Ayrıca saptanan tüm FAdV-8b’lerin kendi aralarında %100 homolojiye sahip olduğu belirlenmiştir. Damızlık aşı durumuna göre seçilen kümeslerin aşısız damızlıklardan elde edilen yavru hatlarında, aşılanmış kümeslere göre FAdV teşhisinin 5 kat fazla olduğu görülmüştür. Elde edilen hekson loop-1 gen bölgesi dizileri GenBank veri bankasına girilerek erişim numaraları alınmıştır. Hekson loop-1 gen bölgesinin Türkiye ve dünyadan çeşitli hekson gen bölgesi dizileri ile filogenetik analizi gerçekleştirilmiş ve Endonezya (%100) ile Türkiye’den (%96,72-%96,48) daha önce bildirilen FAdV-8b serotipleri ile yüksek homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. FAdV-8b’lerin filogenetik bağlantıların daha iyi anlaşılabilmesi ve moleküler epidemiyolojisi hakkında daha derin bilgilere sahip olmak amacıyla pozitif örnekler içerisinde rastgele bir tane seçilerek tüm genom dizileme analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak 45.995 bp uzunluğunda bir *consensus* genom elde edilmiştir. Türkiye’den ilk defa bu tez çalışmasından elde edilen bir FAdV tüm genom dizisinin SUB14015087 erişim kodu ile GenBank veri bankasına girişi gerçekleştirilmiştir. Tüm genom dizilemesi sonucunda elde edilen *consensus* genom FAdV’lerin genetik yapısının daha iyi anlaşılabilmesi için geniş bir veri çıktısı sunmuştur.

Sonuç olarak bu tez çalışması, moleküler yöntemlerle elde edilen verilerin çeşitli filogenetik analizlerle incelenerek FAdV’lerin epidemiyolojisi hakkında geniş çaplı bilgilere ulaşılmasını sağlamıştır. Ayrıca, elde edilen hekson gen bölgesi dizileri ile tüm genom dizilerinin GenBank veri tabanına girişlerinin yapılması, gelecekte yapılacak çalışmalara kaynak oluşturacak önemli bir adımdır. Bu tez çalışması, FAdV kaynaklı hastalıkların korunma ve kontrol çalışmalarının düzenlenmesinde kullanılabilecek değerli moleküler epidemiyolojik bilgiler sunarak, ekonomik kayıpların önüne geçilebilmesi ve koruma kontrol çalışmalarının etkin bir şekilde yürütülebilmesi için FAdV’lerin moleküler epidemiyolojisinin anlaşılmasının önemine vurgu yapmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Etçi Piliç, *Fowl Aviadenovirus*, Hekson Loop-1, Moleküler Epidemiyoloji, Tüm Genom Dizileme

SUMMARY

Determination of Molecular Epidemiology of Fowl Aviadenoviruses Isolated from Broiler Chickens in Turkey

Fowl Aviadenoviruses (FAdVs), found among adenoviruses affecting poultry, are viral agents causing significant economic losses in broiler chicken farming. Given their ability to transmit vertically and horizontally, understanding the epidemiological characteristics of factors in the control of FAdV-related diseases in breeder and broiler chicken flocks is crucial. FAdVs lead to varying mortalities, reaching up to 80% in broiler chickens, causing Inclusion Body Hepatitis (IBH), Hepatitis-Hydropericardium Syndrome (HHS), and Adenoviral Gizzard Erosion (AGE). These viruses predominantly affect young broiler chickens. Due to the dominance of different genotypes of FAdVs in various geographical regions, targeted studies focusing on genotypes are essential in protection-control programs.

The aim of this thesis is to determine the circulating field serotypes of FAdVs in regions with intensive broiler chicken farming in Turkey, revealing the dominant genotypes and molecular epidemiologies. To achieve this goal, samples were taken, considering epidemiologically important parameters such as breeding vaccination status, age, and transmission routes. Viral DNA obtained from liver and cloacal swab samples was diagnosed for FAdV using PCR with primers targeting the hexon loop-1 gene region. The results indicated that 30% of the sampled flocks over two breeding periods were FAdV positive, with 50% positivity in non-vaccinated flocks and 10% in vaccinated ones. Hexon gene sequence analysis was conducted to identify the circulating serotypes in FAdV-positive flocks. The analysis revealed that all isolated FAdVs from both liver and cloacal swabs resembled the FAdV-8b serotype, showing 100% homology among themselves. FAdV diagnosis was five times more frequent in the offspring lines derived from non-vaccinated breeders compared to those from vaccinated breeders. The obtained hexon loop-1 gene sequences were entered into the GenBank database, and phylogenetic analysis demonstrated a high homology between FAdV-8b serotypes from Turkey and those previously reported from Indonesia and worldwide, with percentages ranging from 96.48% to 96.72%. To gain a deeper understanding of the genetic structure of FAdV-8b, a random positive sample was selected for whole-genome sequencing analysis, resulting in a consensus genome of 45,995 base pairs. For the first time, the FAdV whole-genome sequence from this thesis was deposited in the GenBank database under the accession number SUB14015087. The consensus genome from whole-genome sequencing provided a comprehensive data output for a better understanding of the genetic structure of FAdVs.

In conclusion, this thesis has provided extensive insights into the epidemiology of FAdVs through the examination of molecular data using various phylogenetic analyses. The entry of hexon gene sequences and whole-genome sequences into the GenBank database is a crucial step in serving as a valuable resource for future studies. By offering valuable molecular epidemiological information, this thesis underscores the importance of understanding the molecular epidemiology of FAdVs for organizing protective and control measures against FAdV-related diseases. Emphasizing the need to comprehend the molecular epidemiology of FAdVs is essential for mitigating economic losses and effectively implementing protection and control programs.

Keywords: Broiler, *Fowl Aviadenovirus*, Hexon Loop-1, Molecular Epidemiology, Whole-Genome Sequencing

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Sınıflandırma	1
1.2. Morfoloji ve Genom Organizasyonu	3
1.3. Virus Replikasyonu	5
1.4. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler	6
1.5. Nekropsi ve Histopatoloji Bulguları	7
1.6. Teşhis	8
1.7. Kimyasal ve Fiziksel Etkenlere Duyarlılık	9
1.8. Koruma ve Kontrol Uygulamaları	9
2. GEREÇ VE YÖNTEM	12
2.1. Gereç	12
2.1.1. Örneklem	12
2.1.2. Ticari Kimyasal ve Solüsyonlar	13
2.1.3. Laboratuvar Ekipmanları	14
2.1.4. Dizi Analiz Programları ve Veritabanları	14
2.2. Yöntem	15
2.2.1. Örneklerin Hazırlanması ve Nükleik Asit Ekstraksiyonu	15
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Agar Jel Elektroforezi	16
2.2.3. Hekzon Gen Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz	17
2.2.4. Tüm Genom Dizileme	19
2.2.4.1. Primerlerin Tasarlanması	19
2.2.4.2. Yeni Nesil Dizileme	21
2.2.4.3. Biyoinformatik Analizler	21
2.2.4.4. Filogenetik Analizler	21
3. BULGULAR	23
3.1. Klinik ve Nekropsi Bulguları	23
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Agaro Jel Elektroforezi Bulguları	23
3.3. Hekzon Gen Bölgesi Dizi Analizi Bulguları	26
3.4. Tüm Genom Dizileme Bulguları	31
4. TARTIŞMA	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	46
EKLER	52
Ek-1	52
ÖZGEÇMİŞ	72

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması kapsamında, Türkiye’de etçi piliçlerden izole edilen *Fowl Aviadenovirus* etkenlerinin moleküler yöntemlerle genotiplendirilmesi ve bulaşma yollarının araştırılarak sahada sirkülasyonda olan *Fowl Aviadenovirus*’ların epidemiyolojisine yönelik bulguların ortaya konulması amaçlanmıştır.

Tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bana yol gösteren, ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK başta olmak üzere değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, yardımlarını esirgemeyen öğretim üyeleri; Prof. Dr. Hakan YARDIMCI, Prof. Dr. Mehmet AKAN, Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU ve Doç. Dr. İ. Başak MÜŞTAK’a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Doktora eğitimim boyunca değerli arkadaşlıkları ve yardımlarıyla bana destek olan sevgili Şimal YÖRÜK, Kamil BATUR, Doruk KORALTAY, Mertkan GACAROĞLU, Kemal ŞAD, Özgür ÖZTÜRK, Ayça KURTBEOĞLU, Batuhan ÖĞRENENEFE, Akın ÜNAL, Seyyide SARIÇAM İNCE, Ebru YAVRUCU ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Tüm akademik hayatım boyunca desteklerini ve sevgisini eksik etmeyen, özverileriyle beni onurlandıran aileme en samimi minnetlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Absorbans değeri
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AGE	Adenoviral Taşlık Erozyonu
AGPT	Agar Jel Presipitasyon Testi
bç	Baz çifti
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BuDR	5-Bromodesoxyuridine
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi
FAdV	<i>Fowl Aviadenovirus</i>
HHS	Hepatitis Hidroperikardiyum Sendrom
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
IBH	İnklüzyon Cisimcikli Hepatitis
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IuDR	5-Iododesoxyuridin
kb	Kilobaz
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ML	Maximum-Likelihood
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFW	Nükleaz içermeyen su
ng	Nanogram
NJ	Neighbor-Joining
nmol	Nanomol
°C	Santigrat derece
ORF	Open Reading Frame/Açık Okuma Bölgesi
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pH	Potential of hydrogen
pmol	Pikomol
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Dakikadaki devir sayısı
RSS	Runting-Stunting Syndrome
sn	Saniye
SPF	Specific Pathogen Free/Belirli Patojenlerden Ari
TBE	Tris-Borate-EDTA
U	Unit
UV	Ultraviyole
V	Volt
WGS	Whole Genome Sequencing/Tüm Genom Dizileme



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Kanatlı adenoviruslarının karakteristik çift liflerini (fiber yapısı) gösteren, negatif boyalı, uranil asetatla saflaştırılmış, virus parçacığı	4
Şekil 1.2. Adenoviridae ailesi içinde bulunan farklı adenovirus cinslerinin genom organizasyonlarının şematik gösterimi	5
Şekil 3.1. FAdV kaynaklı hastalık şüpheli hayvanların nekropsi incelemesinden elde edilen makroskopik bulgular	23
Şekil 3.2. Bazı FAdV pozitif örneklerin jel elektroforez görüntüsü	24
Şekil 3.3. Tez çalışmasında elde edilen Hekzon Loop-1 gen bölgesi dizileri ile Türkiye ve dünyadan farklı serotiplere ait rastgele seçilmiş diziler kullanılarak çizilen filogenetik ağaç	28
Şekil 3.4. Tez çalışmasında elde edilen FAdV-8b Hekzon Loop-1 gen bölgesi dizileri ile Türkiye ve dünyadan rastgele seçilmiş hekzon gen bölgesi dizileri kullanılarak çizilen filogenetik ağaç	29
Şekil 3.5. Tasarlanan primerlerin genom üzerinde bulunduğu konum ve üst üste binme bölgelerinin gösterilmesi	35
Şekil 3.6. Gradient PCR sonrası elde edilen ampliconların jel görüntüsü	35
Şekil 3.7. Çalışma kapsamında oluşturulan ANK_UNI_WGS_Consensus genomu ve seçilen genom seti ile çizilmiş filogenetik ağaç	39

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. <i>Fowl Aviadenovirus</i> türleri, serotipleri ve serotip isimlerinin kısaltmalarını gösterir çizelge	2
Çizelge 2.1. Kümes yetiştirme dönemi, yaş grubu ve aşı durumuna göre toplanan örnek sayıları	13
Çizelge 2.2. PCR ve Sanger dizi analizinde kullanılan primer seti özellikleri	17
Çizelge 2.3. DNA dizi analizi PCR bileşen ve hacimleri	18
Çizelge 2.4. DNA dizi analizi PCR döngü koşulları	18
Çizelge 2.5. Tüm genom dizileme için kurulan Gradient PCR bileşen ve hacimleri	20
Çizelge 2.6. Tüm genom dizileme için kurulan Gradient PCR koşulları	20
Çizelge 2.7. Amplikon havuzlarına ait konsantrasyon ve hacim bilgileri	21
Çizelge 3.1. FAdV yönünden pozitif çıkan kümeslerin aşı durumu, gün ve dönem bilgilerini gösterir çizelge	25
Çizelge 3.2. GenBank erişim numarası alınan FAdV Hekzon Loop-1 gen bölgesi dizilerinin aşı durumu, kümes numarası, yaş ve yetiştirme dönemine göre kodlanmasını gösterir çizelge	26
Çizelge 3.3. Filogenetik ağaç oluşturulurken kullanılan referans dizilere ait meta veriler	27
Çizelge 3.4. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında kullanılan referans gen dizilerinin tez çalışmasından elde edilen Hekzon Loop-1 gen bölgeleri (OR670689-OR670712) ile filogenetik benzerlik oranları	30
Çizelge 3.5. Tüm genom dizilemede kullanılan primerlerin adı, içinde bulunduğu havuz, yönü, konumu, dizisi, uzunluğu, GC oranı ve erime sıcaklığı (T _m)	31
Çizelge 3.6. Tüm genom dizisi ile oluşturulan filogenetik ağaçta kullanılan referans dizilere ait bilgiler	36

1. GİRİŞ

Kanatlı hayvanları etkileyen *Aviadenovirus* genusunda yer alan ve temel olarak tavuk patojenleri olarak bilinen *Fowl Aviadenovirus* (FAdV) nedenli hastalıklar dünya genelinde birçok bölgeden bildirilmektedir (Chen vd., 2019; Franzo vd., 2020; Mirzazadeh vd., 2021; Oliver-Ferrando vd., 2017). FAdV'ler inklüzyon cisimcikli hepatitis (IBH), hepatitis hidroperikardiyum sendromu (HHS) ve adenoviral taşlık erozyonu (AGE) gibi özellikle etçi piliç yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan hastalıklarla ilişkilendirilmektedirler (Chen vd., 2019; Lai vd., 2021; Schachner vd., 2018). Son yıllarda moleküler yöntemlerin yaygın kullanımı ile FAdV salgınlarında rol alan baskın genotipler incelenmekte ve epidemiyolojik önemlerinin ortaya konulmasına çalışılmaktadır (Chen vd., 2019; Franzo vd., 2020). Konu ile ilgili Türkiye'de de yapılmış çalışmalar bulunmasına karşın etçi piliçlerde FAdV'lerin bulaş yollarının belirlenmesi ve epidemiyolojik durumu hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır (Cizmecigil vd., 2020; Şahindokuyucu vd., 2020).

FAdV enfeksiyonlarının epidemiyolojik çalışmalar ile izlenmesi, etkin korunma kontrol programlarının oluşturulması ve salgınların engellenmesi açısından oldukça önemlidir (Marek vd., 2010).

1.1. Sınıflandırma

Adenoviridae ailesi içerisinde *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus*, *Ichadenovirus* ve *Testadenovirus* olmak üzere altı cins bulunmaktadır. Kanatlıları enfekte eden adenoviruslar ise *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* cinsleri içinde yer almaktadır. *Aviadenovirus* cinsi altında temel olarak tavuk patojenleri olarak kabul edilen kümes hayvanları adenovirusları (*Fowl Aviadenovirus*, FAdV A-E) ve şahin *Aviadenovirus* A (*Falcon Aviadenovirus* A), kaz *Aviadenovirus* (*Goose Aviadenovirus* A), güvercin *Aviadenovirus* (*Pigeon Aviadenovirus* A), ördek *Aviadenovirus* B, hindi *Aviadenovirus* B türleri ve henüz tam olarak klasifiye edilmemiş bazı kanatlı hayvanların adenovirusları bulunmaktadır. Adenoviruslar kendi aralarında DNA polimeraz genini baz alan filogenetik uzaklığa bağlı olarak sınıflandırılmaktadır ve bazı cinslerin sınıflandırılmasında konak, genom organizasyonu, restriksiyon enzim fragmentinin uzunluğundaki farklılıklar gibi özellikler de kullanılarak sınıflandırılma yapılmaktadır. FAdV'lar kendi aralarında beş ayrı türe (A-E) ve çapraz nötralizasyon testleri ile 12 farklı

(FAdV 1-8a, 8b, 9, 10, 11) serotipe ayrılmıştır (Hess, 2000; MacLachlan ve Dubovi, 2016; Marek vd., 2010; Şahindokuyucu ve Yazıcı, 2019). *Fowl Aviadenovirus* türleri ve serotipleri, serotip isimlerinin kısaltmalarıyla Çizelge 1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. *Fowl Aviadenovirus* türleri, serotipleri ve serotip isimlerinin kısaltmalarını gösterir çizelge (Benko vd., 2022)

Tür Adı	Serotip Adı	Serotip Adı Kısaltması
<i>Fowl Aviadenovirus A</i>	<i>Fowl Adenovirus 1</i>	FAdV-1
<i>Fowl Aviadenovirus B</i>	<i>Fowl Adenovirus 5</i>	FAdV-5
<i>Fowl Aviadenovirus C</i>	<i>Fowl Adenovirus 4</i>	FAdV-4
<i>Fowl Aviadenovirus C</i>	<i>Fowl Adenovirus 10</i>	FAdV-10
<i>Fowl Aviadenovirus D</i>	<i>Fowl Adenovirus 9</i>	FAdV-9
<i>Fowl Aviadenovirus D</i>	<i>Fowl Adenovirus 2</i>	FAdV-2
<i>Fowl Aviadenovirus D</i>	<i>Fowl Adenovirus 3</i>	FAdV-3
<i>Fowl Aviadenovirus D</i>	<i>Fowl Adenovirus 11</i>	FAdV-11
<i>Fowl Aviadenovirus E</i>	<i>Fowl Adenovirus 6</i>	FAdV-6
<i>Fowl Aviadenovirus E</i>	<i>Fowl Adenovirus 7</i>	FAdV-7
<i>Fowl Aviadenovirus E</i>	<i>Fowl Adenovirus 8a</i>	FAdV-8a
<i>Fowl Aviadenovirus E</i>	<i>Fowl Adenovirus 8b</i>	FAdV-8b

Kümes hayvanı adenovirusunun (FAdV) hekson geni, korunmuş bölgeleri ve hiperdeğişken (HVR1-4) bölgeleri içeren spesifik yapısı nedeniyle detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Genellikle FAdV'lerin taksonomisi ve antijenik özellikleri üzerine odaklanan araştırmalarda hekson loop-1 gen bölgesi hedef alınmaktadır (Niczyporuk, 2016). Karşılaştırmalı analizler, hipervirulent FAdV-4 izolatlarının çeşitli genomik delesyonlar ve ana yapısal genler olan fiber-2 ve hekson üzerinde çeşitli mutasyonlar içerdiğini göstermiştir (Zhang vd., 2018).

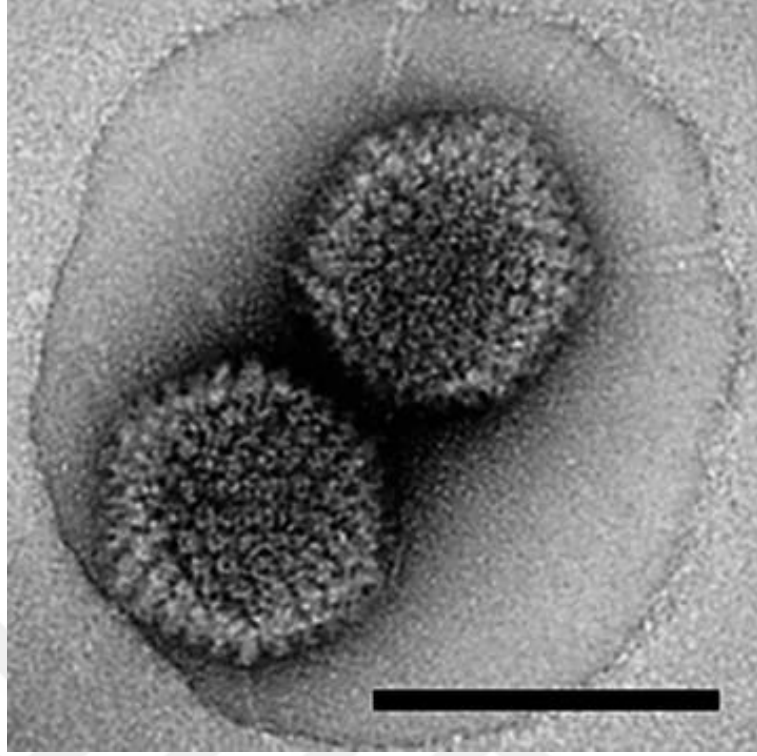
Kanada FAdV izolatlarının hekson loop-1 gen bölgesi dizi analizine dayalı genotiplemesi, FAdV-2, FAdV-8a ve FAdV-11 ile genetik bir ilişki göstermiştir (Ojkic vd., 2008). Güney Kore tavuklarında hekson loop-1 gen dizilerinin filogenetik analizi, birden fazla FAdV serotipinin varlığını ortaya koymuştur (Lai vd., 2021). Güneybatı Çin'de, hekson loop-1 gen bölgesine dayalı filogenetik analizler, FAdV-4, FAdV-2, FAdV-8a ve FAdV-8b dahil olmak üzere farklı serotipleri ayırmakta başarılı olmuştur (Xia vd., 2017).

Hekson geninin yüksek oranda korunmuş bölgesinin tam kodlama dizisinin amplifikasyonu için özel primerler tasarlanmıştır (Cui vd., 2020). Ayrıca, hekson geni, Çin,

Malezya ve Pakistan gibi çeşitli coğrafi bölgelerdeki FAdV suşlarının moleküler karakterizasyonu ve filogenetik analizi için kullanılmıştır (Hu vd., 2021; Sohaimi vd., 2022). Hekzon geni, farklı çalışmalarda serotip tanımlama ve FAdV genomunun tespiti için de kullanılmıştır (Mase vd., 2009; Sabarudin vd., 2021; Silaen vd., 2020). Ayrıca, hekzon geni, FAdV-4'ün genetik evrimsel ilişkisini analiz etmek için kullanılarak FAdV patojenitesi ile ilişkilendirilmiştir (Ahmed vd., 2021; Yu vd., 2019). Hekzon geni, genel olarak FAdV'lerin moleküler farklılaşması ve patojenite değerlendirmesi için kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve kullanılmıştır (Marek vd., 2010).

1.2. Morfoloji ve Genom Organizasyonu

Adenovirüsler altıgen görünüme sahip, ikozahedral simetrik, ortalama 70-90 nm çapında, zarfsız, DNA virüsleridir. Virion yapısı 252 kapsomer içermektedir. Virion 240 tane vertex olmayan kapsomer (hekzon) ve 12 tane vertex kapsomerden (penton bazları) oluşmaktadır. Verteks kapsomerlerin üzerinde fiber adı verilen protein çıkıntıları bulunmaktadır ve memeli adenovirüslerinde her bir pentonik yapıda bir adet bulunur. Kanatlı adenovirüslerinde ise bu çıkıntılar memeli adenovirüslerinden farklı olarak her bir vertex yapısında ikişer tanedir (Benko vd., 2022; Hess, 2000; Hess, 2019; Şahindokuyucu ve Yazıcı, 2019). Şekil 1.1.'de *Fowl Aviadenovirus D* (FAdV-9) üzerinden kümes hayvanı adenovirüslerinin karakteristik çift fiber lifleri gösterilmiştir.

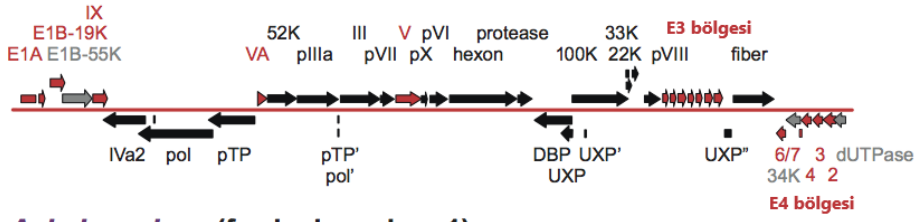


Şekil 1.1. Kanatlı adenoviruslarının karakteristik çift liflerini (fiber yapısı) gösteren, negatif boyalı, uranil asetatla saflaştırılmış, virus parçacığı

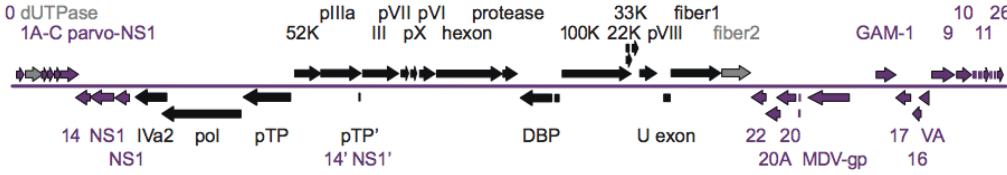
Çubuk uzunluğu (nm): 100 (Gelderblom ve Maichle-Lauppe, 1982)

Adenovirus genomu ortalama 26-48 kb büyüklüğünde, lineer çift zincirli DNA içerir. Viral genom ortalama 40 protein kodlamaktadır ve bu proteinlerin üçte biri yapısal proteinlerdir. Yapısal proteinler hekzonların, pentonların, penton fiberlerinin, virion çekirdeğinin yapımında görev alır. Fiber yapıları hücreye tutunma ve hücre etkileşimlerinde önemli bir role sahiptir. *Mastadenovirus*'lar, *Aviadenovirus*'larda bulunmayan proteinlere (protein V ve protein IX) sahiptir. *Aviadenovirus*'lar ayrıca bu proteinleri kodlayan genlerden de yoksundur, buna rağmen çeşitli özel genler içerdikleri için genomları *Mastadenovirus*'lardan %20-45 daha büyüktür (Hess, 2019; MacLachlan ve Dubovi, 2016). Hekzon proteini virionun yüzey ile temasını sağlayan önemli bir kapsid yapısı olarak, grup, tip ve alt tiplere özgü antijenik determinantları barındırır. Hekzon geni bu özelliği ile FAdV'lerin saha suşlarının genetik yakınlıklarının ve epidemiyolojik özelliklerinin ortaya konulmasında önem taşır (Chen vd., 2019; Oliver-Ferrando vd., 2017; Şahindokuyucu vd., 2020; Zhang vd., 2018). *Adenoviridae* ailesi içerisinde bulunan çeşitli genom organizasyonları Şekil 1.2.'de gösterilmiştir.

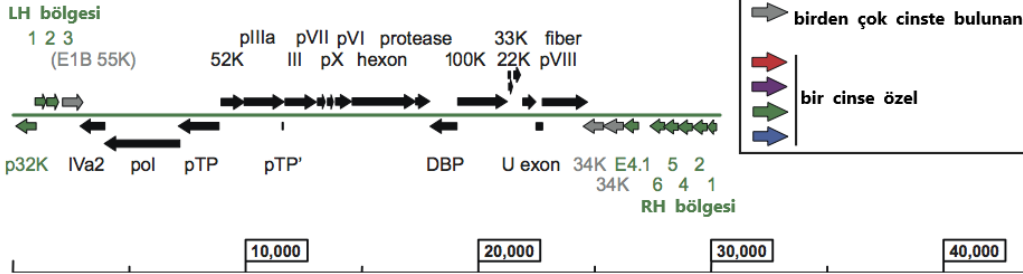
Mastadenovirus (human adenovirus 2)



Aviadenovirus (fowl adenovirus 1)



Atadenovirus (ovine adenovirus 7)



Şekil 1.2. *Adenoviridae* ailesi içinde bulunan farklı adenovirus cinslerinin genom organizasyonlarının şematik gösterimi (Benko vd., 2022)

Siyah oklar her cinstе korunan kodlama dizilerini gösterir, gri oklar birden fazla cinstе mevcut olanları gösterir ve renkli oklar cinse özgü proteinlerin kodlama dizilerini gösterir.

1.3. Virus Replikasyonu

Adenovirusların replikasyon süreci erken ve geç olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Erken aşama, virusun konak hücreye girişini ve virus DNA'sının çekirdeğe transferini kapsar. Erken aşamayı erken genler (Early genes, E) olarak adlandırılan genlerin transkripsiyon ve translasyonu takip eder. Erken genler (E) tarafından kodlanan proteinler, virus DNA'sının replikasyonunu ve bunun sonucunda geç genlerin (Late genes, L) kodlanmasını sağlar. Geç genler (L) virusun yapısal proteinlerinin transkripsiyonunu ve translasyonunu kolaylaştırmak için hücresel fonksiyonları yeniden yönlendirir. Oluşan viral proteinlerin virionlar halinde birleşmesi çekirdekte tamamlanır, bunu nükleer membranın akabinde hücrenin parçalanması ve hücreden virusun salınması takip eder (Benko vd., 2022; Hess, 2019).

1.4. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler

Aviadenovirus'lar hem evcil kanatlı hayvanlar hem de yabani kuşlardan izole edilebilmektedir. Kanatlı adenoviruslarının çoğu oportunistik patojenler olarak tanımlanmaktadır ve immunsupresyon gibi çeşitli predispoze faktörler sonucunda hastalık oluşturmaktadırlar (Chen vd., 2019). Farklı türler arasında virülens farklılıkları bulunmakta ve konağın yaşı ya da virusun titresi gibi faktörler virülensi etkileyebilmektedir. FAdV'lar konakta aynı anda farklı türleri ve serotipleri ile bulunabilmektedir (Hess, 2000; Lai vd., 2021; Schachner vd., 2021).

FAdV'lar hem vertikal hem de horizontal olarak bulaşabilmekte ve dünya çapında yaygın olarak görülmektedir. Tüm yaş grubundan hayvanların etkilenebilmesine rağmen, genç hayvanlar FAdV enfeksiyonlarına daha duyarlıdır. Vertikal bulaşma ile subklinik enfeksiyona sahip damızlıklardan yavrulara geçen FAdV'lar şiddetli enfeksiyonlar oluşturarak önemli verim kayıplarına neden olmaktadır (Mirzazadeh vd., 2021). Horizontal bulaşma ise temel olarak fekal-oral yolla gerçekleşmektedir. Virus dışkı, trakeal mukoza, nasal mukoza, bağırsaklar, sekal tonsiller ve böbreklerde bulunabilir. Saçılım ise tüm ekskretlerle olabilmekte ve en yoğun virus titresi dışkıda bulunmaktadır (Cizmecigil vd., 2020; Hess, 2019). FAdV'ler dışkıda haftalarca kalabilmekte ve virusun dışkı ile saçılımı hem virus suşunun özelliklerine hem de konağın yaşına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yaşlı kuşlar daha kısa süre, daha düşük titrelerde virus saçılımına neden olur. Horizontal bulaşmada, özellikle kümesler arası fomitler, personel ve kontamine aşılar bulaşmada önemlidir ancak aerosol yol bulaşmada etkili görülmemektedir (Hess, 2019).

Virusun inkubasyon periyodu konağın yaşına, virusun bulaş yoluna bağlı olarak değişmektedir ve genellikle 24-48 saat gibi oldukça kısa sürede gerçekleşmektedir. FAdV ile enfekte hale gelen konakta sıklıkla persiste, kronik bir enfeksiyon gelişir ve iyileşen kuşlar yaşamları boyu saçılıma neden olabilirler. İmmunsupresif etkenler virus saçılımının artmasına neden olur (Hess, 2019; Kaján, 2016). FAdV'ler çoğunlukla tavuklarda özellikle etçi piliçlerde inklüzyon cisimcikli hepatitis (IBH), hepatitis hidroperikardiyum sendromu (HHS), adenoviral taşlık erozyonları (AGE), ventrikülitis, proventrikülitis, enteritis, RSS (Runting-Stunting Syndrome) yani malabsorbsiyon sendromu ile ilişkilendirilmiştir (Hess, 2000; Kaján, 2016; MacLachlan ve Dubovi, 2016). FAdV serotiplerinin hepsi dünyada IBH olgularında etken olarak belirlenmiştir (Chen vd., 2019). FAdV-D ve FAdV-E grubuna ait

serotipler daha çok IBH, FAdV-C grubundan FAdV-4 HHS, FAdV-A grubu serotipleri ile FAdV-8 ise AGE olgularının etkenleri olarak bilinmektedir (Hess, 2019).

FAdV'ler genç yaştaki tavukların, özellikle etçi piliçlerin adenoviral enfeksiyonlarında primer etiyolojik etkenler olarak dikkati çeker (Hess, 2019; Kaján, 2016). IBH genellikle ani ölümlerle başlayan ve 3-4 günlük yaşlarda ölümlerde pik yaparak beşinci gün itibarıyla ölümlerin yavaşladığı bir hastalıktır (Hess, 2019; Schachner vd., 2018). Hastalığın morbiditesi düşük, mortalitesi ise %30'lara kadar çıkabilir ve genel olarak 3-7 haftalık yaşta etçi piliçleri etkiler. Üç haftalık yaştan küçük etçi piliçlerde mortalite daha yüksek seyreder ve enfeksiyon çoğunlukla vertikal bulaşma sonucu ortaya çıkmıştır (Hess, 2019). Hastalıktan etkilenen hayvanlar çömelme pozisyonunda durur, tüyler karışıktır ve 48 saat içinde ölüm ya da iyileşmeyle seyreden klinik tabloya sahiptir. HHS klinik olarak IBH'a benzer semptomlarla seyretmesine rağmen çok daha şiddetli klinik tablolar oluşturarak mortalite %80'lere kadar çıkabilir ve hastalığın şiddetine bağlı yaşlı kuşlarda da ölümler görülebilir. Etçi piliçlerde AGE klinik olarak kümeste üniformitenin bozulması, büyüme geriliği ile artan mortalite dışında belirgin semptomlara sebep olmaz ve hastalık çoğunlukla kesimhanede ortaya çıkar (Schachner vd., 2018).

Adenovirusların horizontal olarak etkili bir şekilde yayıldığı, persiste ve latent enfeksiyonlara neden olabileceği bilinmektedir (Bertran vd., 2021; Hess, 2000; Philippe vd., 2007). Birçok sürüde, özellikle de ilk enfeksiyondan 8 ila 12 hafta sonra bağışıklığın zayıfladığı dönemde periyodik virus saçılımı gösterilmiştir. Ayrıca, yumurta üretiminin pik yaptığı dönemde virus saçılımının yükselmesi hem horizontal hem de vertikal bulaşma açısından önem taşır (Philippe vd., 2007; Schachner vd., 2021).

1.5. Nekropsi ve Histopatoloji Bulguları

IBH'den etkilenen etçi piliçlerde nekropsi bulguları temel olarak, solgun, çabuk parçalanmış ve şişmiş karaciğer bulgularıdır. Bunun yanında karaciğerde beyaz fokal lezyonlar, ekimotik kanamalar ya da peteşiler gözlemlenebilmektedir. Böbreklerde glomerulonefrite bağlı şişkinlik görülebilir. Karaciğer ve böbrek dışında pankreas, bursa Fabricius, kemik iliği ve timusta da patolojik değişimler gözlemlenebilmektedir. HHS nekropside IBH'ye benzer ancak daha şiddetli karaciğer ve böbrek lezyonlarına neden olur. Perikardiyal kesede pembemsi şeffaf sıvı birikimi ve pulmoner ödem, şişmiş ve solgun karaciğer, genişlemiş tübüller ve şişmiş böbrekler dikkati çeker. Karaciğer ve kalpte peteşiler

ve fokal nekroz da eşlik edebilir. Şiddetli enfekte kuşlarda asites tablosu oluşabilir. AGE'den etkilenen hayvanların nekropsisinde hemorajik sıvıya bağlı genişlemiş taşlık ve koilin tabakasında siyah renkli yapışık erozyonlar dikkati çeker (Hess, 2019; Kaján, 2016; Schachner vd., 2018, Schachner vd., 2021).

IBH ve HHS'ye bağlı histopatolojik değişimler içinde karaciğer, pankreas, böbrekler, taşlık ve bağırsak gibi etkilenen organda bazofilik intranükleer inklüzyon cisimciklerinin görülmesi karakteristiktir. Böbreklerde glomerulonefritis, pankreasta nekroz, kalpte miyokarditis ve hemorajiler, bursa Fabricius'ta folikül atrofisi ve hemorajiler dikkati çeker. AGE'de koilin tabakasında nekroz ile glandular epitelyal hücrelerde intranükleer inklüzyon cisimcikleri görülür. Lamina propria, submukoza ve kas tabakasında makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu gözlenir (Hess, 2019; Naguib vd., 2021; Schachner vd., 2018; Steer-Cope vd., 2017).

1.6. Teşhis

FAdV enfeksiyonlarına sahip hayvanlardan teşhis için karaciğer, böbrek, pankreas gibi etkilenmiş organ materyalleri ve dışkıdan virus izolasyonu ya da bu materyallerden moleküler teşhis yöntemleri kullanılarak direkt teşhis yapılabilir. Virus izolasyonu için hücre kültürü inokulasyonları kullanılabilir. Embriyolu tavuk yumurtaları FAdV'lerin primer izolasyonunda kullanılmak için yeterli duyarlılığa sahip değildir. FAdV'lerin teşhisinde konvansiyonel ve moleküler yöntemler kullanılabilir (Kaján, 2016). FAdV'lerin serolojik tanısına yönelik geleneksel yöntemler içerisinde agar jel presipitasyon testi (AGPT) ve virus nötralizasyon (VN) testleri bulunmaktadır. Agar jel presipitasyon testi (AGPT), FAdV antikorlarının tespitinde yaygın olarak kullanılan bir serolojik test olup, hızlı ve ekonomik olma avantajlarına sahiptir. Ancak, AGPT'nin düşük duyarlılığa sahip olması ve kümes hayvanlarında presipitat oluşumunun FAdV'ye ikinci maruziyetten sonra gelişebilmesi nedeniyle enfeksiyonun saptanmasında gecikmeye yol açabilen dezavantajları bulunmaktadır. AGPT, genellikle çoklu adenovirus serotiplerine maruz kalan ticari sürülerden alınan serum üzerinde tatmin edici bir duyarlılığa sahip olabilir; ancak, spesifik patojen içermeyen (SPF) sürülerdeki adenovirus enfeksiyonlarını saptamada daha az duyarlıdır (Pan vd., 2020). Bu nedenle, FAdV'lerin tespiti için daha basit, hızlı ve hassas bir tanı yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır; bunun için geniş ölçekli serolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan ELISA'nın kullanımı öne çıkmaktadır. FAdV'lerin gruba özgü veya tipe özgü antikorların serolojik teşhisinde ELISA sıklıkla kullanılmaktadır

(Calnek vd., 1982). Bu testler genellikle AGPT'den daha duyarlıdır ve SPF sürüleri adenovirus antikorları açısından taramak için tercih edilen yöntemdir. Calnek ve arkadaşları (1982) tarafından belirtildiği gibi, çeşitli FAdV serotipleri arasındaki çapraz reaksiyon, heterolog FAdV serotiplerine maruz kalmanın hassas bir şekilde tespit edilmesinin temelini oluşturur. Hücre kültürü, virus nötralizasyon testleri, serolojik ve immunohistokimyasal yöntemler ile in situ hibridizasyon gibi klasik yöntemlerin yerini günümüzde moleküler yöntemler almaya başlamıştır (Malik vd., 2019; Marek vd., 2016; Schachner vd., 2021; Steer vd., 2009).

Moleküler yöntemler ile salgın durumlarında daha hızlı sonuç almak, saha suşlarının epidemiyolojik özellikleri ortaya konularak biyogüvenlik önlemlerinin alınması ve koruma kontrol programlarının oluşturulması daha kolay hale gelmiştir. Günümüzde FAdV teşhisinde hekzon gen bölgesini hedef alan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli yöntemler kullanılmaktadır. Hekzon gen bölgesi mutasyonlara karşı oldukça duyarlıdır ve bu özelliği sayesinde serotip tayini de özellikle Loop-1 bölgesi kullanılarak yapılmaktadır (Hess, 2019; Kaján, 2016; Marek vd., 2010). PCR ile amplifiye edilen hedef Hekzon gen bölgesinin dizilenmesi ile filogenetik analizler yapılmakta ve serotip ilişkili genotiplerin de belirlenmesi bu sayede mümkün olmaktadır (Schachner vd., 2016).

1.7. Kimyasal ve Fiziksel Etkenlere Duyarlılık

Avian Adenovirus'lar tipik olarak eter ve kloroform, sodyum deoksikolat, trypsin, %2 fenol ve %50 alkol gibi lipid solventlere karşı dayanıklıdır. Adenoviruslar 3 ile 9 arasındaki pH değişimlerine direnç göstermektedir. Ancak 1:1000 formaldehit konsantrasyonu ile etkisiz hale getirilebilirler. DNA inhibitörleri olan IuDR ve BuDR ile inhibe edilebilirler. Adenoviruslar genel olarak 56°C'ye 30 dakika maruz bırakıldıktan sonra sulu çözeltilerde inaktif hale gelir ve divalent iyonlar ile ısı stabilitesi azaltılabilir. FAdV'ler diğer adenoviruslara göre ısıya daha dayanıklıdır. Bazı suşlar 60°C'de, hatta 70°C'de 30 dakika boyunca hayatta kalabilir (Benko vd., 2022; Hess, 2019; MacLachlan ve Dubovi, 2016).

1.8. Koruma ve Kontrol Uygulamaları

Aviadenovirus'lara yönelik kümes izolasyonu ve dezenfeksiyon uygulamaları özellikle horizontal bulaşmanın engellenmesinde önemlidir. Kümesler geçirimsiz zemin ve

duvarlara sahip olmalıdır. Ayrıca çevresel bulaşın en aza indirilmesini hedef alan kümes yönetimi ile bulaş riskini ortadan kaldırmak mümkündür. FAdV, horizontal bulaşmanın dışında embriyolu tavuk yumurtası vasıtasıyla vertikal bulaşma ile aktarıldığı bilinmektedir (Li vd., 2017; Marek vd., 2010; Schachner vd., 2018, 2021). Vertikal bulaşmanın engellenmesi için spesifik patojen içermeyen (Specific Pathogen Free, SPF) damızlıkların seçilmesi ve/veya FAdV'ye karşı aşılanmış damızlık sürülerin tercih edilmesi etkilidir (Alvarado vd., 2007; Bertran vd., 2021; El-Shall vd., 2022; Schachner vd., 2021). Maternal antikorlar sayesinde özellikle IBH olgularında damızlıklara uygulanan doğru aşılama takvimleri ile civcivlerde tam koruma sağlanabildiği bildirilmiştir. Bu durumlar göz önüne alındığında etkin koruma kontrolün sağlanabilmesi için aşılanmanın damızlık seviyesinden başlatılması önemlidir (Grafl vd., 2012; Gupta vd., 2017; Kim vd., 2014; Schachner vd., 2018).

Dünyada ve Türkiye'de FAdV kaynaklı hastalıklara karşı geliştirilmiş canlı ve inaktif aşılar bulunmaktadır (Cizmecigil vd., 2020; Hess, 2019; Schachner vd., 2021). Bölgesel salgınların önlenmesinde otojen aşılar da tercih edilebilmektedir. Ayrıca sub-unit ve vektör aşı çalışmaları da yürütülmektedir. FAdV tipleri (A-E) ve serotipleri arasında çapraz koruma bulunmamaktadır. Bu nedenle geniş spektrumlu aşılarda geliştirilmesi ya da ihtiyaç dahilinde salgınlara neden olan baskın genotiplerin belirlenerek spesifik aşılamaların uygulanması üzerine çalışılmaktadır (Cizmecigil vd., 2020; Hafez, 2011; Hess, 2000; Steer-Cope vd., 2019; Steer vd., 2009).

FAdV kaynaklı hastalıklara neden olan serotipler coğrafi olarak farklılık göstermektedir (Kaján, 2016; Marek vd., 2010). Bu nedenle farklı coğrafya ve bölgelerde yapılan çalışmalarla hastalık etkeni olan baskın serotiplerin belirlenmesi ve epidemiyolojik önemlerinin ortaya konulması gerekmektedir. Türkiye'de etçi piliçlerde FAdV enfeksiyonları üzerine yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Cizmecigil vd., 2020; Şahindokuyucu vd., 2020; Şahindokuyucu ve Yazıcı, 2019).

Fowl Adenovirus'ların bulaş yollarının belirlenmesi, baskın serotiplerin tespiti ve bu serotiplerin moleküler epidemiyolojilerinin araştırılması, FAdV kaynaklı hastalıkların etkili bir şekilde kontrolü için kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda, koruma ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi ile aşılama prosedürlerinin belirlenmesi gerekmektedir. FAdV'lerin epidemiyolojisiyle ilgili geniş bir bilgi havuzunun oluşturulması, etkili koruma-kontrol programlarının oluşturulması ve uygulanması için temel bir adımdır. Bu nedenle, bu

alandaki çalışmaların sürekliliği, FAdV'lerin yayılma mekanizmalarını ve genetik varyasyonlarını daha iyi anlamak amacıyla önemlidir. Bu tez çalışmasında Türkiye’de dolaşımda olan FAdV serotiplerinin belirlenmesi ve moleküler epidemiyolojisi hakkında daha geniş bilgilere ulaşılması amaçlanmıştır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Örneklem

Tez çalışması kapsamında, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na Batı Karadeniz, Ege ve Marmara bölgelerinde yer alan, rastgele örneklemeye seçilmiş, 20 aşılı ve 20 aşısız, FAdV şüpheli klinik semptomların ve ölümlerin görüldüğü etçi piliç yetiştirme kümeslerinden örnekler gönderildi. Kümeslerden iki farklı yetiştirme döneminde (1. dönem ve 2. dönem) örnekler gönderildi. Hem aşılı hem de aşısız kümes gruplarında birinci ve ikinci yetiştirme dönemi arası kümeslere yeni yavru girişi sağlanmadan önce gerekli temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerinin yapıldığı ortalama 15 günlük bir dönem bulunmaktadır. Bu dönem, kümeslerdeki biyogüvenlik uygulamalarının fekal-oral yolla horizontal bulaşmaya etkisinin, kloakal sıvaplar aracılığıyla incelenmesi için önem taşır. Aşılı kümes olarak gruplandırılan kümesler, damızlık hattı aşılannmış etçi piliç sürülerinin temsil etmektedir. Bir yetiştirme dönemi içerisindeki üç farklı yaş grubundan (ilk gün, 14. gün ve 28. gün) örnekler toplandı.

Her bir yaş grubundan beşer karaciğer (KC) ve beşer kloakal sıvap (KS) örneği olmak üzere toplam 100 KC ve 100 KS örneği toplandı. FAdV kökenli etçi piliçlerde meydana gelen hastalıkların büyük çoğunluğunda karaciğerin etkilenmesi nedeniyle organ örneği olarak karaciğer seçildi. Horizontal bulaşmada fekal-oral yolla bulaşmanın incelenmesi açısından ise kloakal sıvap örnekleri tercih edildi. Böylece bir yetiştirme dönemi içerisinde 300 KC ve 300 KS örneği toplandı. İki farklı yetiştirme döneminde aşılı ve aşısız kümeslerden toplam 1200 KC ve 1200 KS örneği elde edildi. Laboratuvara gelen örnekler, her bir örnek tipi kendi içerisinde olacak şekilde beşer beşer havuzlanarak, sonuçta 240 KC ve 240 KS örneği analiz edilmek üzere hazırlandı. Toplanan örneklerle ait kümes yetiştirme dönemi, yaş grubu ve aşı durumlarına göre toplanan örnek sayıları Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Kümes yetiştirme dönemi, yaş grubu ve aşı durumuna göre toplanan örnek sayıları

Yetiştirme dönemi	1. Dönem		2. Dönem	
Yaş grubu	Aşılı kümes (n=20)	Aşısız kümes (n=20)	Aşılı kümes (n=20)	Aşısız kümes (n=20)
1.gün	100 KC, 100 KS	100 KC, 100 KS	100 KC, 100 KS	100 KC, 100 KS
14.gün	100 KC, 100 KS	100 KC, 100 KS	100 KC, 100 KS	100 KC, 100 KS
28.gün	100 KC, 100 KS	100 KC, 100 KS	100 KC, 100 KS	100 KC, 100 KS
Toplam	300 KC, 300 KS	300 KC, 300 KS	300 KC, 300 KS	300 KC, 300 KS

KC: karaciğer örneği, KS: kloakal sıvı

Kümeslerden gönderilen örnekler rutin sakrifiye edilen ve/veya FAdV ilişkili semptomlara (büyüme geriliği, bitkinlik, kabarık tüyler, vb.) sahip hastalık şüpheli ölmüş hayvanlardan rastgele örnekleme yöntemi ile seçildi. Örnekler belirtilen günlerde, kümeslerden laboratuvara soğuk zincirde gönderildi. Gönderilen örnekler, nükleik asit ekstraksiyonu yapılana kadar -20°C’de saklandı.

2.1.2. Ticari Kimyasal ve Solüsyonlar

Tez çalışması için kullanılan tüm kimyasallar ve solüsyonlar aşağıda maddeler halinde gösterilmiştir:

- Viral DNA Ekstraksiyon Kiti: HiPurA® Viral DNA Purification Kit, Hindistan
- Primerler: Primer 200 nmol HPLC 250 Baz
- Taq DNA Polimeraz: Hi-Proof, DNA Polymerase 500 U
- dNTP karışımı: dNTP Mix 40mM
- Moleküler saf su: Moleküler biyoloji sınıfı su
- Agaroz: Prona, Biomax
- TBE çözeltisi: 10X TBE HiMedia®
- DNA Ladder: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (SM0321)
- Yükleme solüsyonu: Thermo Scientific, 6x Loading Dye
- Boyama solüsyonu: Hi-SYBr Safe Jel Boyası
- Agaroz: Biomax Prona Agaroz
- Saflaştırma kiti: ExoSAP-IT
- Sephadex: Sephadex® G-100, Sigma-Aldrich, ABD

2.1.3. Laboratuvar Ekipmanları

Tez çalışması için kullanılan tüm laboratuvar ekipmanları ve marka, modelleri aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- Biyolojik güvenlik kabini: Safe 2020 laminar flow
- Isıtıcı blok: DryBlock Heating Thermostat Bio TDB-200
- Vortex: Fine Vortex (FinePCR) Thermo Scientific, ABD
- Santrifüj: Micro CL21, Thermo Scientific™, ABD
- Soğutmalı Santrifüj: Hermle Z446K
- Spektrofotometre: Thermo Scientific NanoDrop 1000 cihazı, ABD
- Pipetler: Thermo Scientific (Finnpipette F1) 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl
- Termal cykler: Thermo Scientific ARKTIK Thermocycler, ABD
- Jel elektroforez ünitesi: Thermo Scientific Thermo Owl A2 large Gel System, 20 x 25 cm ebatındaki jel elektroforez ünitesi, ABD
- Jel elektroforez ünitesi tarakları: Thermo Scientific A2-24D tarak (1,5 mm kalınlık, 6,5 mm genişlik, 7 µl hacim, 24 adet kuyucuk) ve A2-36D tarak (1,5 mm kalınlık, 3,5 mm genişlik, 4 µl hacim, 36 adet kuyucuk), ABD
- Güç kaynağı: WEALTEC ELITE 300 Plus Power Supply
- Hassas terazi: Scaltec, SBC41, Almanya
- Görüntüleme cihazı: SYNGENE G: Box, UV transillüminatörlü görüntüleme sistemi
- Dizi analiz cihazı: ABI 3500 Genetik Analyzer
- Tüm genom dizileme cihazı: Oxford Nanopore Technologies, MinION
- Florometre: Qubit, Thermo Fisher Scientific, ABD

2.1.4. Dizi Analiz Programları ve Veritabanları

Tez çalışması için kullanılan tüm bilgisayar yazılımları ve sürümleri aşağıda maddeler halinde gösterilmiştir:

- CLC Main Workbench: Qiagen 7.7.3 versiyonu, Sanger DNA dizi analizi ile edilen dizileri hizalamada ve filogenetik ağaçlandırmada kullanılacak veriyi elde etmede kullanıldı.

- Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA): Filogenetik ağaç oluşturmak için MEGA Versiyon 11.0.10 kullanıldı.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI): *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* ile elde edilen dizileme verilerinin verifikasyonu ve dizilerin GenBank veri tabanına girilmesi için kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Hazırlanması ve Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Toplanan ve havuzlanan örneklerin nükleik asit ekstraksiyonuna takip eden günler içinde başlandı. Aynı kümeslere ait KC ve KS örnekleri her biri kendi arasında 1:10 derişimli PBS (Phosphate Buffered Saline) içerisinde toplanarak havuzlandı. Havuzlanan örnekler nükleik asit ekstraksiyonu için mekanik olarak homojenize edildi. Havuzlanan ve homojenize edilen karaciğer doku örneklerinden ticari bir ekstraksiyon kiti (HiPurA® Viral DNA Purification Kit, HiMedia, Hindistan) ile üreticinin protokolüne uygun şekilde viral DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi (Cizmecigil vd., 2020; Franzo vd., 2020). Viral DNA ekstraksiyon kiti içerisinde; sulandırma solüsyonu (1X PBS), lizis solüsyonu (C1), konsantre ön yıkama solüsyonu (PW), konsantre yıkama solüsyonu (WS), elüsyon solüsyonu (RNase-Free Water), proteinaz K, taşıyıcı RNA, HiElute Miniprep kolonları (kapaklı toplama tüpü içinde), toplama tüpleri (kapaksız) ve toplama tüpleri bulunmaktadır.

Viral DNA ekstraksiyonu protokolünün ana basamakları aşağıdaki gibidir:

1. Ekstraksiyon hazırlık aşaması
 - Örneğin homojenizasyonu ve ekstraksiyon için sulandırılması
2. Lizis aşaması
 - Proteinaz K eklendi (enzimatik lizis reaksiyonu için)
 - Lizis solüsyonu ve reaksiyon koşullarını sağlayacak (56°C’de 15 dakika) sıcaklık ve sürede inkubasyon gerçekleştirildi
3. Bağlanma aşaması
 - Bağlanmaya hazırlık aşaması
 - (i) Etanol (%96-100 derişimde) eklendi (Lizatın kolona bağlanması)
 - (ii) Oda sıcaklığında (20-25°C) inkubasyon ve santrifüj aşamaları ile lizatın kolona bağlanması sağlandı

- Ön yıkama aşaması
- Yıkama aşaması

Ön yıkama (PW) ve yıkama (WS) solüsyonu ile DNA'nın diğer lizat materyallerinden ayrıştırılması sağlandı

4. Toplama aşaması

Yıkama aşaması sonrası etanol ile ikinci yıkama yapıldı (ve kolonun etanolden arınması için 56°C'de 3 dakika inkubasyonu sağlandı

5. Elüsyon aşaması

Kolonda toplanan viral DNA'nın elüsyonu için 20-150 µl aralığında elüsyon solüsyonu kullanıldı ve santrifüje edilerek saklama koşullarına uygun kapaklı toplama tüpünde toplandı

Elde edilen DNA ekstraktlarının konsantrasyonları ve saflık ölçümleri Thermo Scientific NanoDrop 1000 cihazı ile gerçekleştirildi. DNA örneklerinin konsantrasyonları 260 nm'de yapılan ölçümler ile belirlendi. DNA örneğinin konsantrasyonu µg/ml cinsinden "50 x A260 x seyreltme faktörü" formülü ile hesaplandı. Absorbans okumaları 260 nm'de 0,1 ile 1,0 arasında tutuldu. Elde edilen DNA örneğinin saflığı ölçülürken 260 nm'de ölçülen absorbans değerinin 280 nm'de ölçülen absorbans değerine oranı ile belirlendi. Bu oranın 1,6-1,9 aralığında olmasına dikkat edildi. Spektrofotometrik analiz sonucu moleküler işlemlere hazır hale getirilen DNA örnekleri -20°C'de saklandı.

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Agar Jel Elektroforezi

FAdV varlığını belirlemek amacıyla konvansiyonel PCR yöntemi kullanıldı. Bu amaç doğrultusunda KC örneklerinden ekstraksiyon sonu elde edilen viral DNA'lar hekzon loop-1 gen bölgesi hedeflenerek PCR ile amplifiye edildi. PCR testinde kullanılan hekzon loop-1 gen bölgesinin spesifik 590 bp'lik alanının amplifikasyonunda kullanılan primer seti Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. PCR ve Sanger dizi analizinde kullanılan primer seti özellikleri

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	Pozisyon	Uzunluk	Kaynak
Hex L1-F	ATGGGAGCSACCTAYTTTCGACAT	301-323	≈590 bp	(Raue vd., 2005)
Hex L1-R	AAATTGTCCCKRAANCCGATGTA	890-868		

Optimize edilmiş PCR reaksiyonu, ileri ve geri primerden 2 µL (10 pmol), 2,5 µL 10x PCR Buffer (Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD), 14,8 µL Nuclease Free Water, 3 µL MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL dNTP (10 mM), 0,2 µL Taq Polimeraz ve 2 µL DNA olmak üzere toplam 25 µL reaksiyon hacminden oluşturuldu. PCR reaksiyonunun koşulları; 94°C'de 3 dakika ön denatürasyon, 30 döngüden oluşan 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 54°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama ve son olarak 72°C'de 7 dakika son uzama olarak ayarlandı. Tüm PCR reaksiyonları için pozitif ve negatif kontroller dahil edildi. Çalışmada sekans analizi ile FAdV-11 serotipine ait olduğu belirlenen GenBank erişim numarası OP985298 olan FAdV suşu, negatif kontrol olarak ise moleküler saf su kullanıldı.

PCR amplikonları, Hi-SYBr Safe Gel Stain (HiMedia, Hindistan) ile %1,5 agaroz jele yüklendi, 0,5X TBE Buffer içinde koşturuldu. Elektroforez sonunda UV transillüminatörde agar jelin görüntüleri alınarak pozitif sonuçlar kaydedildi.

Karaciğer örneklerinden PCR ile FAdV varlığı belirlenen tüm kümeslerin KS örnekleri de PCR ile test edilerek patojen FAdV saçılımı araştırıldı.

2.2.3. Hekzon Gen Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz

PCR sonucu FAdV yönünden pozitif çıkan amplikonlar, *ExoSAP-IT*TM (Thermo Scientific, ABD) ile enzimatik olarak saflaştırıldı. Her bir PCR pozitif amplikon için ürünün protokolüne uygun olarak 5 µL PCR amplikonu ile 2 µL *ExoSAP-IT*TM kullanıldı. Döngü koşulları ise 37°C'de 30 dakika ve 80°C'de 15 dakika olarak uygulandı.

Saflaştırılan amplikonların Hekzon geni Loop-1 bölgesinin 590 bp'lik fragmenti zincir sonlandırma PCR'si ile amplifiye edildi. Bu aşamada, ileri (Hex L1-F) ve geri (Hex L1-R) primerler kullanıldı. Zincir sonlandırma PCR'sine ait reaksiyon hacimleri Çizelge 2.3.'te gösterilmiştir. Zincir sonlandırma PCR'sine ait reaksiyon koşulları Çizelge 2.4.'te

gösterilmiştir. Zincir sonlandırma PCR'si *BigDye™ Direct Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, ABD) protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Çizelge 2.3. DNA dizi analizi PCR bileşen ve hacimleri

Bileşen	Hacim (µl)
Deiyonize su	2
BigDye	2
5x Buffer	2
Primer	2
Kalıp DNA	2
Toplam	10

Çizelge 2.4. DNA dizi analizi PCR döngü koşulları

PCR basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	96	1 dk	-
Denatürasyon	96	10 sn	25
Bağlanma	50	5 sn	
Uzama	60	4 dk	

İleri ve geri primerler ile gerçekleştirilen sekans PCR'ı sonrası elde edilen amplikonlar, Sephadex (Oxoid, Birleşik Krallık) jel filtrasyon yöntemi ile saflaştırıldı. Jel filtrasyonu ile dizilemeye uygun hale getirilen amplikonlar, ABI 3500 dizileme cihazı (Applied Biosystems, ABD) ile çift yönlü olarak dizilendi.

Dizileme sonucu elde edilen sekans verileri *CLC Genomic Workbench v6.0* ile incelendi. Her iki yönlü okuma sonuçları hizalanarak elde edilen yaklaşık 590 bp'lik dizi *National Center for Biotechnology Information* BLAST analizi kullanılarak serotip bazında teşhis edildi. Serotipleri belirlenen tüm örneklerle ait hekzon gen dizileri ve bu gen dizilerine en çok benzeyen hekzon gen dizileri NCBI GenBank'tan temin edilerek *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11* (MEGA 11) yazılımı ile hekzon genleri için filogenetik ağaç oluşturuldu (Cizmecigil vd., 2020; Franzo vd., 2020).

2.2.4. Tüm Genom Dizileme

Gerçekleştirilen hekzon loop-1 gen bölgesi Sanger dizi analizi sonrası yapılan filogenetik analiz sonunda çizilen ağaçta aynı taksonda yer alan örneklerden rastgele bir örnek seçilerek tüm genom dizilemesi gerçekleştirildi. Tüm genom dizileme ampikon bazlı dizileme yöntemi ile, seçilen örneğin direkt KC dokusundan elde edilmiş nükleik asit örneğinden gerçekleştirildi. Elde edilen tüm genom datası GenBank'a yüklendi. Ampikon bazlı tüm genom dizilime için MinION (Oxford Nanopore Technologies) yeni nesil dizileme cihazı kullanıldı.

2.2.4.1. Primerlerin Tasarlanması

Adenovirus'un ampikon bazlı olarak tespitine yönelik geliştirilen yeni nesil dizileme yöntemi için *Fowl Adenovirus E*'ye ait genomlar NCBI'dan indirilerek MEGA programı ile hizalandı. Her gen bölgesine yönelik olan korunmuş ve overlap yapılabilecek bölgeler belirlendi. Adenovirusa ait tüm genomun dizilenebilmesi için tasarlanan primer dizileri tasarlanırken tek bir dizilime spesifik olması, oligonükleotitlerin kendi içinde karşılıklı eşlenik baz dizileri içermemesi, dimer oluşumuna neden olacak şekilde birbirleri ile eşlenik olmaması, uzunluğunun 18-24 baz arasında olması, Tm'lerinin birbirine denk veya yakın olması ve üçten fazla tekrar eden baz olmaması gibi kriterler göz önünde bulunduruldu. Primerler tasarlanırken Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) programı kullanıldı.

Primerlerin spesifik olup olmadığı NCBI Primer-BLAST online programı ile kontrol edildi. Primerler tasarlanırken multipleks reaksiyon yapılabilmesi amacıyla primer bağlanma sıcaklıklarının birbirine yakın olması amaçlandı. Bu amaçla tüm primerler ve problemlerin bağlanma sıcaklıklarının (Tm) yaklaşık 60°C olması sağlandı. Tasarlanan primer setlerinin en iyi hangi sıcaklık değerlerinde çalıştığını bulmak amacıyla 55-65°C arasında gradient PCR yapıldı. Gradient PCR çalışmalarında pozitif kontrol olarak çalışma kapsamında elde edilen pozitif örneklerden yapılan nükleik asit ekstraktları kullanıldı. Gradient PCR kurulum hazırlığında, 100 µM'lık primerlerden eşit miktarda alınarak oluşturulan iki primer havuzu, nükleaz içermeyen su ile 1:9 oranında sulandırıldı. Ardından, her bir primer havuzuna 2x HiFi Taq Master Mix (HF105, MobioMx) enzimi, 0,5 ng/µL kalıp DNA ve 8 µM primer ile beş farklı bağlanma sıcaklığı için gradient PCR reaksiyonu kuruldu. Kurulan gradient PCR bileşen ve hacimleri Çizelge 2.5.'da gösterilmiştir. PCR reaksiyonu BioRad CFX96 cihazında gerçekleştirildi. Kurulan gradient PCR koşulları

Çizelge 2.6.'de yer almaktadır. Çalışmada 54°C, 56,1°C, 58,1°C, 60,3°C ve 62°C sıcaklıkları test edildi.

Çizelge 2.5. Tüm genom dizileme için kurulan Gradient PCR bileşen ve hacimleri

Bileşen	1x Reaksiyon Hacmi	5,5x havuz A	5,5x havuz B
2x HiFi Taq Master Mix	5 µL	27,5 µL	27,5 µL
Primer Mix	0,8 µL	4,4 µL	4,4 µL
DNA	0,4 µL	2,2 µL	2,2 µL
Su	3,8 µL	20,9 µL	20,9 µL
Toplam	10 µL	55 µL	55 µL

Çizelge 2.6. Tüm genom dizileme için kurulan Gradient PCR koşulları

PCR Basamağı	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95°C	1 dk	-
Denatürasyon	95°C	15 sn	
Bağlanma	54-62°C	15 sn	35
Uzama	72°C	30 sn	
Son Uzama	72°C	7 dk	-
Son	4°C	∞	-

Reaksiyon sonunda elde edilen amplikonlar %1'lik agaroz jelde, 2000 bp DNA ladder (DL2-01, MobioMx) ile yürütüldü. Sıcaklıklar arasında en verimli çalıştığı belirlenen iki sıcaklık için PCR ürünlerinin konsantrasyonları Qubit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile spektrofotometrik olarak ölçüldü ve Çizelge 2.7.'de belirtilen şekilde amplikon havuzları oluşturuldu.

Çizelge 2.7. Amplikon havuzlarına ait konsantrasyon ve hacim bilgileri

Havuzlar	Konsantrasyon (ng/ μ L)	64,8 ng Amplikon için Gerekten Miktar (μ L)	Su (μ L)	Son Hacim (μ L)
58,3°C Havuz A	23	2,8	7,3	12
58,3°C Havuz B	33,8	1,9		
60,3°C Havuz A	21,6	3	6,4	12
60,3°C Havuz B	25	2,6		

2.2.4.2. Yeni Nesil Dizileme

Kütüphane hazırlığı Oxford Nanopore Teknolojileri ile Ligasyon temelli kütüphane hazırlık protokolü (SQK-LSK109 ve EXP-NBB104) ile gerçekleştirildi. Amplikon dizileme protokolü takip edilerek örneklerin uç tamiri gerçekleştirildi. Ardından örnekler barkod dizileri eklendi ve eşit miktarda barkodlu amplikon tek bir tüpe pipetlenerek adaptör ligasyonu gerçekleştirildi. Yeterli miktarda kütüphane akış hücresine yüklendi. Gerçekleştirilen dizileme işlemi sonunda örnekten yeterli miktarda veri alındıktan sonra dizileme işlemi durduruldu.

2.2.4.3. Biyoinformatik Analizler

Bu çalışmada, *Fowl Aviadenovirus* E'nin *Oxford Nanopore Technologies* platformu kullanılarak elde edilen dizileme verileri, kapsamlı bir bioinformatik analize tabi tutuldu. İlk adım olarak, *Guppy* yazılımı ile *basecalling* işlemi gerçekleştirildi. Ardından elde edilen ham dizileme verileri, *FastQC* ve *NanoPlot* kullanılarak kalite kontrolünden geçirildi. Kalite kontrol aşamasından sonra, bu veriler *Minimap2* aracılığıyla *Fowl Aviadenovirus* E'nin NC_014969.1 numaralı referans genomuna başarıyla hizalandı. Hizalama işlemi sonrasında, *Samtools* ve *IGV* kullanılarak hizalama kalitesi ve kapsama derinliği analiz edildi. Varyant analizi için, hizalanan veriler *BCFtools* ve *Nanopolish* ile incelenerek, *Fowl Aviadenovirus* E'nin genomik yapıdaki varyasyonları ve potansiyel mutasyonları detaylı bir şekilde ortaya çıkarıldı. Son olarak bir varyasyon analizine dayanarak bir *consensus* genom oluşturuldu. Dizileme sonrası elde edilen tüm genomun GenBank veri bankasına girişi sağlandı ve erişim kodu alındı.

2.2.4.4. Filogenetik Analizler

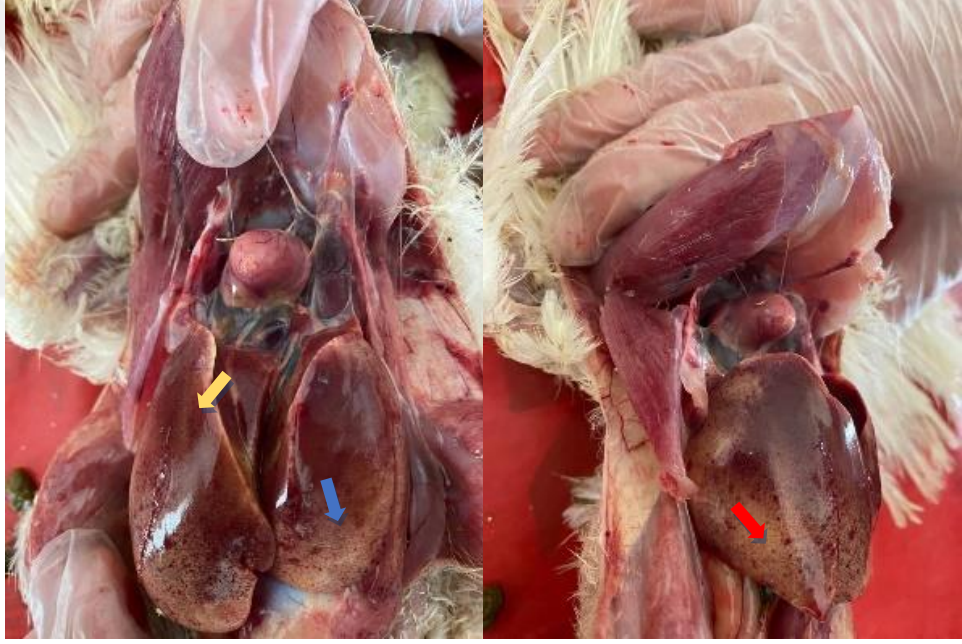
Filogenetik analizler, bioinformatik işlemlerden elde edilen verilerin derinlemesine incelenmesiyle gerçekleştirildi. MEGA v11 yazılımı kullanılarak, elde edilen *consensus* dizi NCBI'dan elde edilen benzer genomlar ile hizalanarak bu hizalama verisi üzerinden çoklu dizilim hizalaması yapıldı. Daha sonra, hizalama verisi kullanılarak *Muscle* algoritması kullanılarak filogenetik ağaç çizimi gerçekleştirildi. Çizilen filogenetik ağaç *iToL* programı yardımıyla görselleştirildi. Bu filogenetik ağaç *Fowl Aviadenovirus* E'nin benzer türler arası ilişkilerini, evrimsel geçmişini ve coğrafi dağılımını aydınlatmakta kullanıldı. Ayrıca, bu analizler virusun ev sahibi değişimleri, adaptasyon süreçleri ve potansiyel evrimsel dinamikleri hakkında önemli bilgiler sağladı.



3. BULGULAR

3.1. Klinik ve Nekropsi Bulguları

Belirtilen günlerde, kümeslerden laboratuvara soğuk zincirde gönderilen örneklerin toplandığı kümeslerin hepsinde büyüme geriliği, bitkinlik, kabarık tüyler gibi klinik semptomlara sahip olduğu belirlendi. Nekropsi sonucu karaciğer solgun renkte, çabuk parçalanan ve şişmiş durumda, karaciğerde beyaz fokal lezyonlar, ekimotik kanamalar ya da peteşiler gözlemlendi. Tez çalışmasında, test edilmek üzere bu tip makroskopik bulgu gösteren KC örnekleri toplandı. Nekropsi sonucu gözlemlenen bazı lezyonları içeren görseller Şekil 3.1’de sunulmuştur.



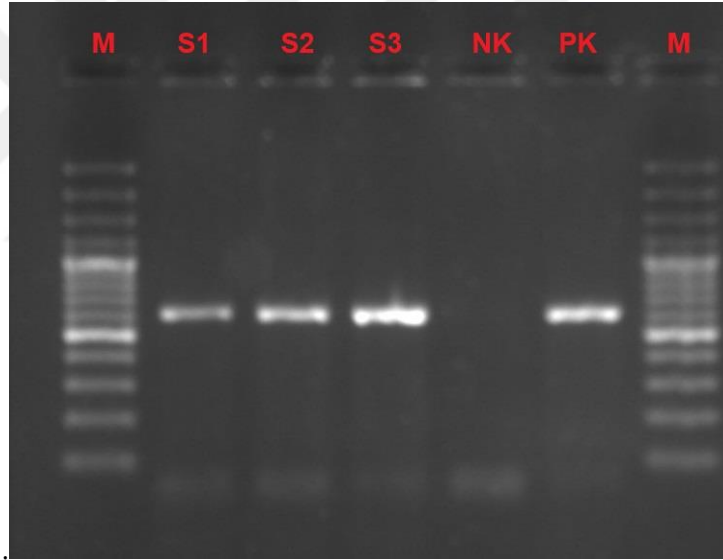
Şekil 3.1. FAdV kaynaklı hastalık şüpheli hayvanların nekropsi incelemesinden elde edilen makroskopik bulgular

Mavi ok: Karaciğerde solgun renk, Sarı ok: Çabuk parçalanan ve şişmiş karaciğer, Kırmızı ok: Ekimotik kanamalar ya da peteşileri göstermektedir.

3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi Bulguları

Örneklerde FAdV varlığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen PCR uygulamaları sonucunda karaciğerde FAdV ilişkili nekropsi bulguları saptanan tüm kümeslerde pozitiflik saptandı. Örneklerin toplandığı 20 aşısız ve 20 aşıllı kümeslerden üç farklı yaş aralığında ve

iki döneminde karaciğer örneklerinden toplamda 42 pozitiflik saptandı. Bu pozitif örneklerin 7 tanesi aşıllı kümeslerden, 35 tanesi aşısız kümeslerden elde edildi. Aşıllı ve aşısız kümeslerde iki yetiştirme döneminde hiçbir küme birinci günde pozitiflik saptanamazken, 14'üncü günde 18 küme, 28'inci günde ise 24 küme pozitiflik saptandı. Aşıllı kümeslerde her iki yetiştirme döneminde de pozitiflik saptanan bir küme belirlendi. Aşısız kümeslerde her iki yetiştirme döneminde pozitiflik saptanan 7 küme belirlendi. Karaciğer örneklerinden pozitiflik saptanan tüm kümeslerde kloakal sıvı örneklerinden de pozitiflik saptandı. Karaciğer örneklerinden FAdV negatif çıkan günlerde, KS örneklerinden aşıllı kümeslerde bir, aşısız kümeslerde ise üç örnekte pozitiflik saptandı. KS örneklerinde toplamda 42 pozitiflik saptandı. Karaciğer örneklerinden FAdV pozitif çıkan günlerde aşısız kümeslerden 4 adet KS örneğinde FAdV negatiflik saptandı. Küme ve dönem bazında elde edilen pozitif sonuçlar bölgeleri ile birlikte Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir. Şekil 3.2.'de ise PCR sonucu pozitif örneklerden elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü sunulmuştur.



Şekil 3.2. Bazı FAdV pozitif örneklerin jel elektroforez görüntüsü

M: Marker; S1: KC/V3-D14-P1, S2: KC/NV8-D14-P1, S3: KS/NV11-D14-P1 kodlu pozitif örnekler; NK: Negatif Kontrol; PK: Pozitif Kontrol.

Çizelge 3.1. FAdV yönünden pozitif çıkan kümeslerin aşı durumu, gün ve dönem bilgilerini gösterir çizelge

Kümeslerin Bulunduğu Bölgeler	KÜMES KODU	AŞILI KÜMES								AŞISIZ KÜMES			
		1. DÖNEM				2. DÖNEM				1. DÖNEM		2. DÖNEM	
		1. GÜN	14. GÜN	28. GÜN	1. GÜN	14. GÜN	28. GÜN	1. GÜN	14. GÜN	1. GÜN	14. GÜN	1. GÜN	28. GÜN
Batı Karadeniz	V1							NV1					
	V2							NV2	KC+KS	KC+KS			
	V3		KC+KS	KC+KS				NV3	KC+KS	KC+KS	KC+KS	KC+KS	KC+KS
	V4							NV4	KS	KC			
Ege Bölgesi	V5		KS	KC+KS				NV5	KC+KS	KC+KS	KC+KS	KC+KS	KC+KS
	V6							NV6					
	V7							NV7					
	V8							NV8	KC+KS	KC+KS	KC+KS	KC+KS	KC+KS
Marmara Bölgesi	V9							NV9	KS	KC+KS			
	V10							NV10					
	V11							NV11	KC+KS	KC+KS			KC
	V12							NV12	KC+KS	KC+KS	KC+KS	KC+KS	KC+KS
Ege Bölgesi	V13							NV13					
	V14							NV14			KC+KS	KC+KS	KC+KS
	V15							NV15					
	V16							NV16	KC+KS	KC+KS	KC+KS	KC+KS	KC+KS
Marmara Bölgesi	V17							NV17					
	V18							NV18			KC+KS	KC	KC
	V19							NV19	KC+KS	KC	KS	KC+KS	KC+KS
	V20							NV20			KC+KS	KC+KS	KC+KS

V1-V20 aralığı aşıli kümesleri NV1-NV20 aralığı ise aşısız kümesleri temsil etmektedir. KC: Karaciğer örneklerinden saptanan, KS: Kloakal sıvay örneklerinden saptanan pozitiflikleri temsil etmektedir.

3.3. Hekzon Gen Bölgesi Dizi Analizi Bulguları

Hekzon gen bölgesi dizi analizi sonucu tüm pozitif örneklerin FAdV-8b genotipine sahip olduğu görüldü. Aynı kümeslerden farklı günlerde saptanan FAdV pozitif örneklerin hekzon gen dizileri karşılaştırıldığında birbirlerine %100 oranında benzediği anlaşıldı. KS örneklerinden yürütülen hekzon loop-1 gen bölgesi dizi analizi sonucu hem kendi aralarında hem de KC örneklerinden elde edilen dizilerle %100 homoloji saptandı. Bu sebeple her kümesi temsilen KC örneklerinden elde edilen sadece bir hekzon loop-1 gen dizisi seçilip GenBank girişi yapılarak erişim numarası alındı. GenBank'a girişi sağlanan hekzon gen bölgesi dizilerinin erişim numaraları ve eşleşen kümes kodları Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. GenBank erişim numarası alınan FAdV Hekzon Loop-1 gen bölgesi dizilerinin aşı durumu, kümes numarası, yaş ve yetiştirme dönemine göre kodlanmasını gösterir çizelge

Erişim Kodu	Kümes Kodu	Pozitiflik Saptanan Günler / Dönem
OR670689	V3-1	14, 28 / 1
OR670690	V5-1	28 / 1
OR670691	V5-2	14, 28 / 2
OR670692	V13-2	14, 28 / 2
OR670693	NV2-1	14, 28 / 1
OR670694	NV3-1	28 / 1
OR670695	NV3-2	14, 28 / 2
OR670696	NV4-1	28 / 1
OR670697	NV5-1	14, 28 / 1
OR670698	NV5-2	14, 28 / 2
OR670699	NV8-1	14, 28 / 1
OR670700	NV8-2	14, 28 / 2
OR670701	NV9-1	28 / 1
OR670702	NV11-1	14, 28 / 1
OR670703	NV11-2	28 / 2
OR670704	NV12-1	14, 28 / 1
OR670705	NV12-2	14, 28 / 2
OR670706	NV14-2	14, 28 / 2
OR670707	NV16-1	14, 28 / 1
OR670708	NV16-2	14, 28 / 2
OR670709	NV18-2	14, 28 / 2
OR670710	NV19-1	14, 28 / 1
OR670711	NV19-2	28 / 2
OR670712	NV20-2	14, 28 / 2

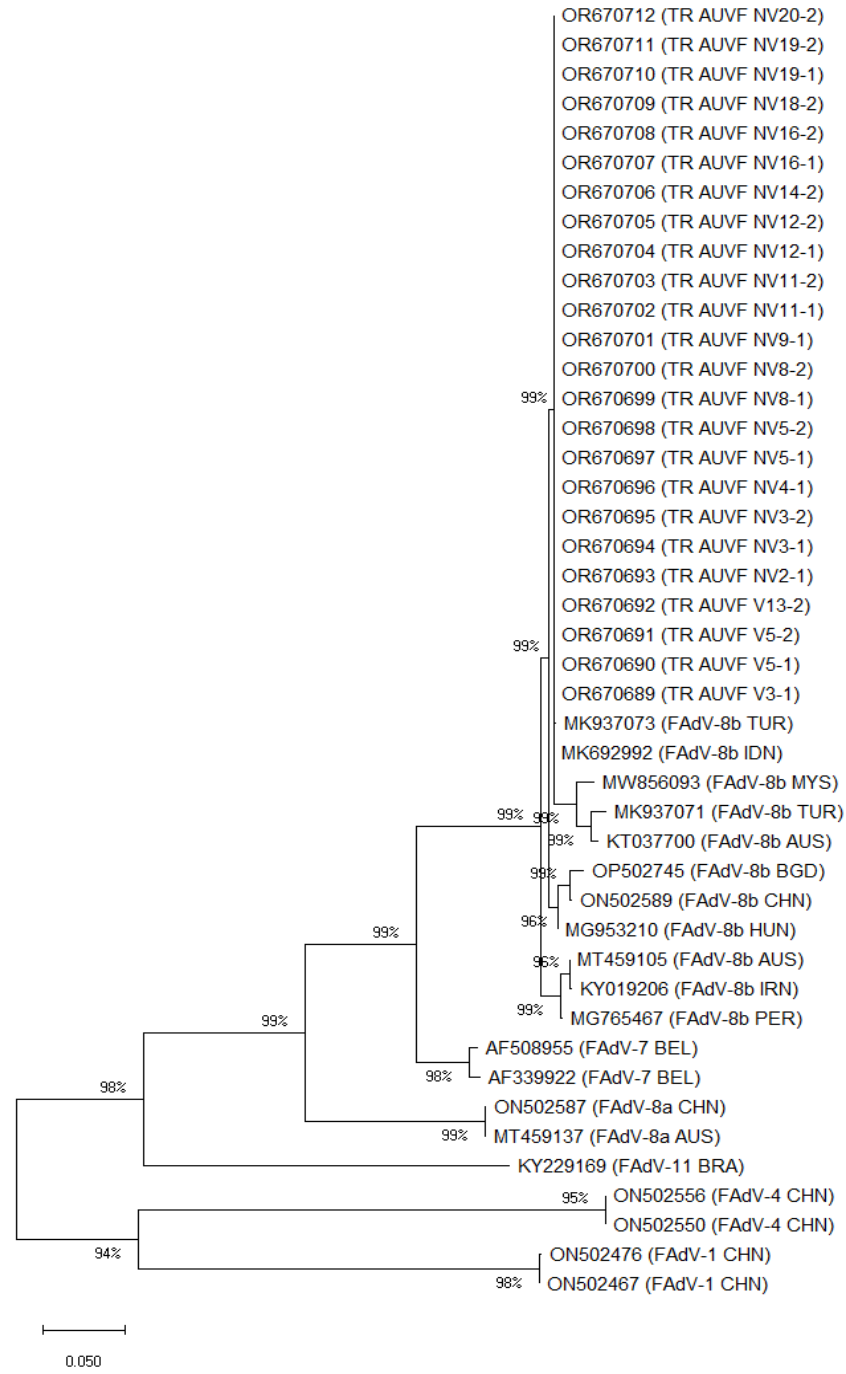
Evrimsel ağaçlar, filogenetik ilişkilerin ortaya konulması amacıyla hekzon gen bölgesi dizileri ile Maximum Likelihood (ML) yöntemi kullanılarak çizildi. Evrimsel ağaçlar Tamura-Nei modeli ile Neighbor-Joining (NJ) algoritması kullanılarak MEGA11 programında oluşturuldu. Filogenetik ağaçlar oluşturulurken kullanılan referans dizilere ait

GenBank erişim bilgileri, bildirildiği ülke, yıl, dizi uzunluğu izolat bilgileri ve ait oldukları tür/serotip bilgileri Çizelge 3.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Filogenetik ağaç oluşturulurken kullanılan referans dizilere ait meta veriler

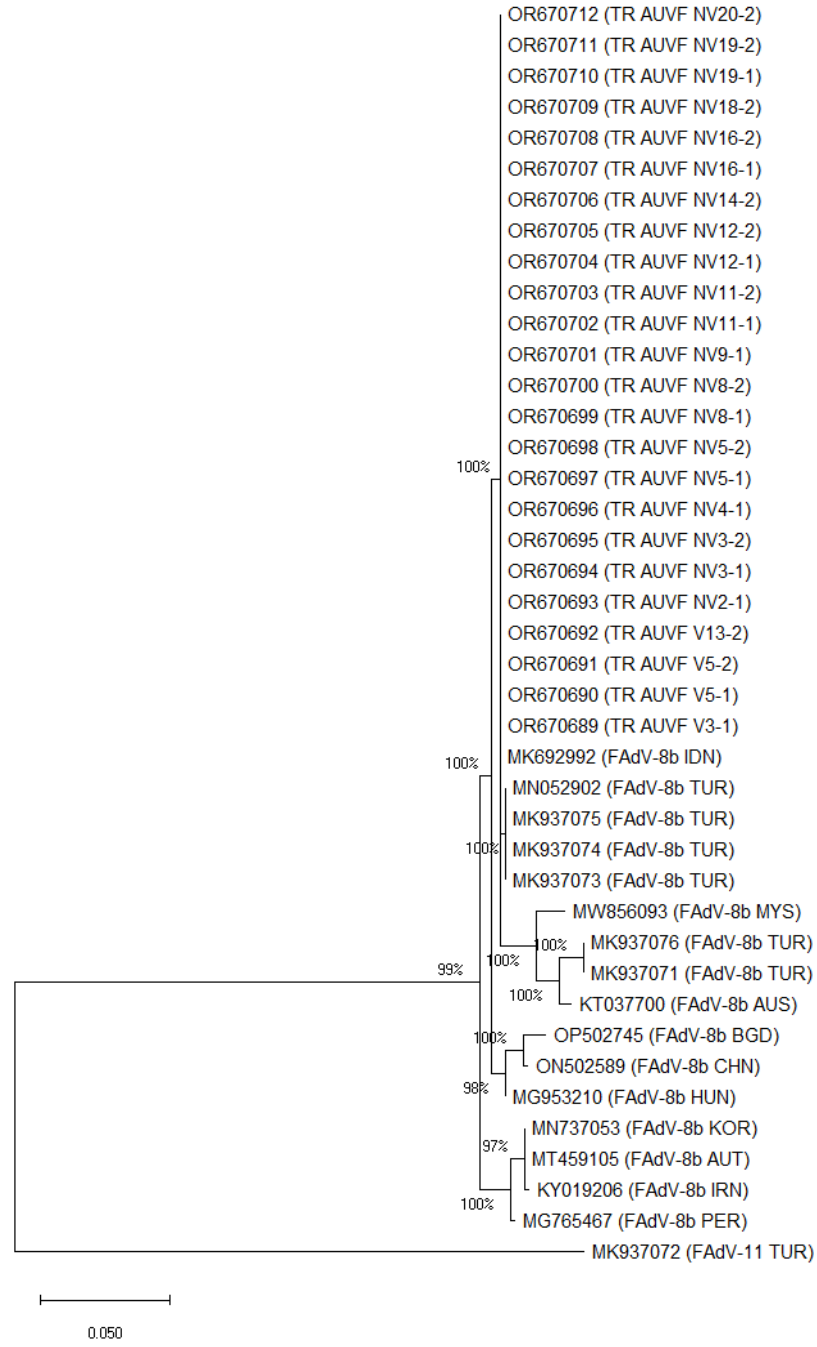
Tür	Serotip	İzolat	Uzunluk (bp)	Erişim numarası	Yıl	Ülke
A	1	FAV1/Jiangxi/chicken/X2122/2019	743	ON502476	2022	Çin
A	1	FAV1/Shanghai/chicken/S2029/2019	743	ON502467	2022	Çin
C	4	FAV4/Jiangxi/chicken/X2001/2019	731	ON502556	2022	Çin
C	4	FAV4/Hubei/chicken/H2176/2019	731	ON502550	2022	Çin
D	11	USP-BR-418.14	798	KY229169	2018	Brezilya
E	7	YR36	899	AF508955	2016	Belçika
E	7	ATCC VR-832; B-3A	902	AF339922	2001	Belçika
E	8a	FAV8a/Jiangxi/chicken/X2225/2019	749	ON502587	2022	Çin
E	8a	FAdV-8a-D4/4	680	MT459137	2021	İran
E	8b	FADV/Gazipur/Bangladesh/G09/2021	709	OP502745	2023	Bangladeş
E	8b	FAV8b/Hubei/duck/H2138/2019	749	ON502589	2022	Çin
E	8b	ADL17 0258	596	MN737053	2020	G. Kore
E	8b	UPM/FAdV/522D/2017	628	MW856093	2021	Malezya
E	8b	FAdV/IRIBH-21	680	MT459105	2021	İran
E	8b	vsn094mlg318	720	MK692992	2019	Endonezya
E	8b	20489-M/2015 Debrecen	549	MG953210	2019	Macaristan
E	8b	ID-HCI-037	846	MG765467	2018	Peru
E	8b	IR/H651.3/13	546	KY019206	2017	İran
E	8b	NSW-6/100932	564	KT037700	2017	Avustralya
E	8b	TR/BVKE/CA/CAK	880	MK937073	2019	Türkiye
E	8b	TR/BVKE/R/B-8	887	MK937071	2019	Türkiye
E	8b	FAdV-E	572	MN052902	2020	Türkiye
E	8b	TR/BVKE/R/Y	884	MK937076	2019	Türkiye
E	8b	R/BVKE/R/D-1	876	MK937075	2019	Türkiye
E	8b	TR/BVKE/CA/CYG	881	MK937074	2019	Türkiye

Elde edilen 24 FAdV-8b hekson loop-1 gen bölgesi dizileri ile Türkiye ve dünyada çeşitli çalışmalarda elde edilmiş farklı FAdV serogruplarına ait hekson loop-1 gen bölgesi dizileri kullanılarak çizilen filogenetik ağaç Şekil 3.3.'te gösterilmiştir. Türkiye ve dünyada yapılmış çalışmalardan elde edilen FAdV-8b hekson gen bölgesi dizileri ile tez çalışmasında elde edilen FAdV-8b dizileri kullanılarak elde edilen ağaç Şekil 3.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Tez çalışmasında elde edilen Hekzon Loop-1 gen bölgesi dizileri ile Türkiye ve dünyadan farklı serotiplere ait rastgele seçilmiş diziler kullanılarak çizilen filogenetik ağaç

Filogenetik ağaç oluşturulurken tez çalışmasında elde edilen 24 adet FAdV-8b hekzon loop-1 gen bölgesi dizisi ve 20 adet referans dizi kullanılmıştır. Filogenetik ağaç MEGA versiyon 11 kullanılarak Neighbore-Joining yöntemi ile oluşturulmuştur.



Şekil 3.4. Tez çalışmasında elde edilen FAdV-8b Hekzon Loop-1 gen bölgesi dizileri ile Türkiye ve dünyadan rastgele seçilmiş hekzon gen bölgesi dizileri kullanılarak çizilen filogenetik ağaç

Filogenetik ağaç oluşturulurken tez çalışmasında elde edilen 24 adet FAdV-8b hekzon loop-1 gen bölgesi dizisi ve 17 adet referans dizi kullanılmıştır. Filogenetik ağaç MEGA versiyon 11 kullanılarak komşu birleştirme yöntemi ile oluşturulmuştur.

Yapılan filogenetik analiz sonucu tez çalışmasında elde edilen tüm dizilerin *Fowl Aviadenvirus* E türü 8b serotipine ait olduğu belirlendi. Türkiye ve dünyanın çeşitli ülkelerinden izole edilen farklı serotipler arasından çalışmada elde edilen ve tamamı %100 homolog olan 24 hekzon loop-1 gen bölgesinin en yüksek homolojiyi (%100) MK692992 erişim numaralı FAdV-8b suşu ile gösterdiği görüldü. Kullanılan FAdV-8b serotipleriyle %100-96,72 aralığında değişmek üzere, benzerliğe sahip olduğu belirlendi. Tez çalışmasında elde edilen FAdV-8b (tamamı birbiri ile %100 homolog) hekzon loop-1 gen bölgesi dizileri ile filogenetik analizde kullanılan referans diziler arasındaki benzerlik oranları Çizelge 3.4.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında kullanılan referans gen dizilerinin tez çalışmasından elde edilen Hekzon Loop-1 gen bölgeleri (OR670689-OR670712) ile filogenetik benzerlik oranları

GenBank erişim numarası	Filogenetik Benzerlik Oranı (%)
MK692992_(FAdV-8b_IDN)	100,00
MK937073_(FAdV-8b_TUR)	99,82
MK937075_(FAdV-8b_TUR)	99,82
MK937074_(FAdV-8b_TUR)	99,82
MG953210_(FAdV-8b_HUN)	99,08
ON502589_(FAdV-8b_CHN)	98,20
OP502745_(FAdV-8b_BGD)	97,83
MG765467_(FAdV-8b_PER)	97,83
KT037700_(FAdV-8b_AUS)	97,47
MW856093_(FAdV-8b_MYS)	97,46
MN737053_(FAdV-8b_KOR)	97,46
MT459105_(FAdV-8b_AUS)	97,46
KY019206_(FAdV-8b_IRN)	97,20
MK937071_(FAdV-8b_TUR)	96,72
MK937076_(FAdV-8b_TUR)	96,72
AF508955_(FAdV-7_BEL)	88,36
AF339922_(FAdV-7_BEL)	87,99
ON502587_(FAdV-8a_CHN)	76,09
MT459137_(FAdV-8a_AUS)	76,08
KY229169_(FAdV-11_BRA)	59,68
MK937072_(FAdV-11_TUR)	58,48
ON502467_(FAdV-1_CHN)	42,92
ON502476_(FAdV-1_CHN)	42,49
ON502556_(FAdV-4_CHN)	41,33
ON502550_(FAdV-4_CHN)	41,33

3.4. Tüm Genom Dizileme Bulguları

Adenovirus tüm genomunu dizilemek için, yaklaşık 1200 baz çifti uzunluğunda 44 çift primer tasarlandı. Tasarlanan primerler ve bu primerlerin özellikleri Çizelge 3.5.'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Tüm genom dizilemede kullanılan primerlerin adı, içinde bulunduğu havuz, yönü, konumu, dizisi, uzunluğu, GC oranı ve erime sıcaklığı (T_m)

Primer Adı	Havuz	Primer Dizisi	Uzunluk	%GC	T _m
adeno_1_LEFT	1	AATACACTCCCCACACCCC	20	60	61,23
adeno_1_RIGHT	1	CGAAGCGCTCTTCCAGATCC	20	60	60,89
adeno_2_LEFT	2	TATAGACGTGGGTGCCGGG	19	63,16	61,05
adeno_2_RIGHT	2	ATCGCTTCGGCCAAGAACG	19	57,89	61,02
adeno_3_LEFT	1	CCCGATCGAAGAGAACCCCT	20	60	61,06
adeno_3_RIGHT	1	GTCACCACCGACCTCAACAG	20	60	60,62
adeno_4_LEFT	2	CGAGCCAGTAGGTGCAGATG	20	60	60,55
adeno_4_RIGHT	2	CAGGCGCGAACTCAAAGACT	20	55	60,96
adeno_5_LEFT	1	GAATTCGGGGGATCGTACAGC	21	57,14	60,97
adeno_5_RIGHT	1	GATCAGCTGCCCACCAACC	19	63,16	60,97
adeno_6_LEFT	2	TCGAAATCCCTGTCCCCCTC	20	60	61
adeno_6_RIGHT	2	ATCCTCTCCTGCCACATCCC	20	60	61,08
adeno_7_LEFT	1	GGAGTAGGTGAGCCAGCTGA	20	60	60,99
adeno_7_RIGHT	1	GACACGGGGACTACCTCTACC	21	61,9	61,12
adeno_8_LEFT	2	GGAAGTCTTGGTCGTCGTGG	20	60	60,68
adeno_8_RIGHT	2	CAATCACGACTCCCTCACGG	20	60	60,47
adeno_9_LEFT	1	TCTCCTCCTCCTCTCCTCGT	20	60	60,64
adeno_9_RIGHT	1	CTGCCTCGAGTACTGCATGC	20	60	61,17
adeno_10_LEFT	2	GTATTGCTGGGGATGGTGGG	20	60	60,48

Çizelge 3.5. Devam

adeno_10_RIGHT	2	CGCAACCACACCTGTAACGA	20	55	60,89
adeno_11_LEFT	1	AGCTGTTTGGAGTGGGGGT	19	57,89	61
adeno_11_RIGHT	1	GTCGCCTCCACGCTCTACTA	20	60	61,11
adeno_12_LEFT	2	CGGGGTTAGATTGCTCGCTC	20	60	60,89
adeno_12_RIGHT	2	CGTTAGCACTCTGGCCACG	19	63,16	61,02
adeno_13_LEFT	1	GAGTCCCCTTCTGTGCGGTGA	20	60	60,92
adeno_13_RIGHT	1	ATGATGATGTTGGCGGCGG	19	57,89	61,11
adeno_14_LEFT	2	CCATGGGAAAGTCTGAGGCG	20	60	60,76
adeno_14_RIGHT	2	GGTTGTTGTACACCCCCACC	20	60	60,84
adeno_15_LEFT	1	AAGATCGCGGCCAAGAACG	19	57,89	61,02
adeno_15_RIGHT	1	GCGGTTCTGCAGCAGGTAG	19	63,16	61,03
adeno_16_LEFT	2	CCTGCGGCTGTACAAAGAGG	20	60	61,04
adeno_16_RIGHT	2	GAAACCCGAAGTCGTGGTGG	20	60	61,24
adeno_17_LEFT	1	TAGGCAAGACAGGGAGAGCG	20	60	61,34
adeno_17_RIGHT	1	GATCACGTCCTGATCGGCAC	20	60	60,89
adeno_18_LEFT	2	GTCGACTTTACGTACAGCCGG	21	57,14	61,15
adeno_18_RIGHT	2	CAGTAGTCGATCTCCTCAACGTG	23	52,17	60,73
adeno_19_LEFT	1	AAGGAAGGGAGGAGGAGGGA	20	60	61,18
adeno_19_RIGHT	1	CGAATCACGCCGCTGTCTT	19	57,89	61,02
adeno_20_LEFT	2	GGAGGCGCTATAAACTGGGC	20	60	60,9
adeno_20_RIGHT	2	ACGGATTGGTCATTTGCCCC	20	55	60,99
adeno_21_LEFT	1	TGCTCGACAGAGGTCCTTCC	20	60	61,27
adeno_21_RIGHT	1	GTTGTCCATCTGGTCGACGG	20	60	60,75
adeno_22_LEFT	2	CCCCGAAACCGATAACGTGG	20	60	61,1
adeno_22_RIGHT	2	GCGTGGACGGAATGGACTC	19	63,16	60,73

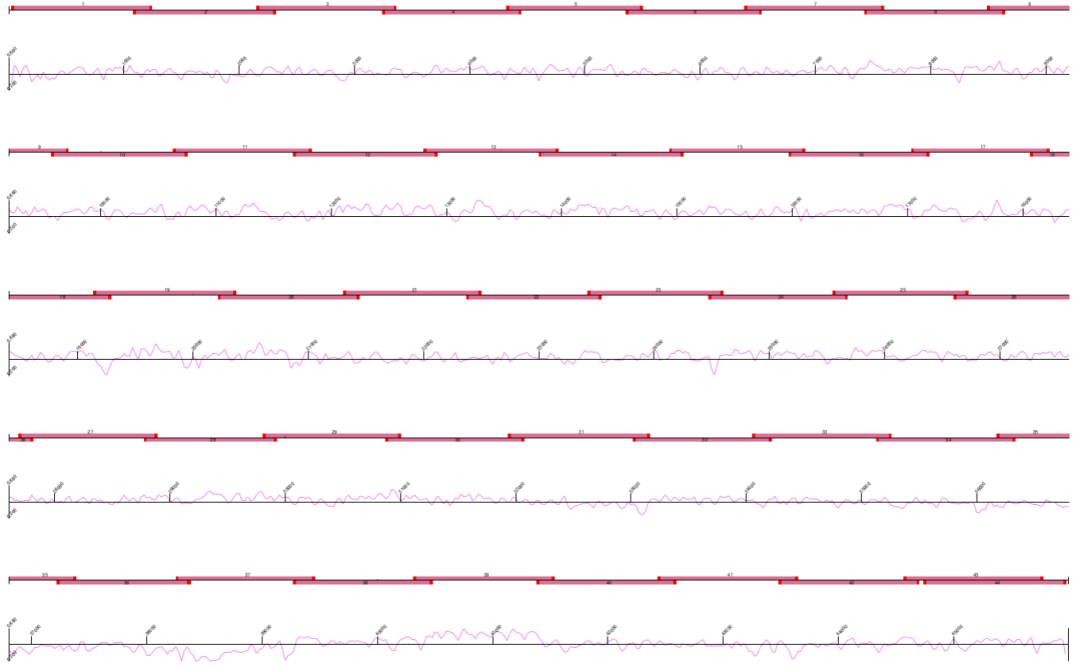
Çizelge 3.5. Devam

adeno_23_LEFT	1	CAACTCGGGCTACATCGCG	19	63,16	61,16
adeno_23_RIGHT	1	GCAAAGGAGACGACGACAGG	20	60	61,03
adeno_24_LEFT	2	CACTACGAGCGACACTGACG	20	60	60,81
adeno_24_RIGHT	2	CCGTAGAGTTTGGCGCTCAG	20	60	61,09
adeno_25_LEFT	1	AGTACCTCCCAGCTTGGTCC	20	60	60,93
adeno_25_RIGHT	1	ATGAGCACACTTGACGGCG	19	57,89	60,95
adeno_26_LEFT	2	GGCGGTTTCGTGGAAGCTATC	20	60	61,17
adeno_26_RIGHT	2	CTGCGGTTGGCTTTGCAAC	19	57,89	60,88
adeno_27_LEFT	1	CCTCCGGAATATCGCGAAGTG	21	57,14	61,03
adeno_27_RIGHT	1	CCACAGGTATCCTCCGTGGT	20	60	60,99
adeno_28_LEFT	2	TACCCCTCCGATTTCGTCCC	20	60	61,06
adeno_28_RIGHT	2	GGTGCCTGACCCAGCTTCTA	20	60	61,57
adeno_29_LEFT	1	AAGGAGCTGAAGAGGCCTCC	20	60	61,29
adeno_29_RIGHT	1	GAAACCACTTCGGCGTCCTC	20	60	61,31
adeno_30_LEFT	2	GCAACTTTCGGGAGGTGTCC	20	60	61,25
adeno_30_RIGHT	2	CCGAGTTCTTTGCCCTGTCC	20	60	60,97
adeno_31_LEFT	1	GGTTGATGACGTCGACTGGG	20	60	60,75
adeno_31_RIGHT	1	GGGACAGGCTGATGGGTATC	20	60	59,62
adeno_32_LEFT	2	CTTCTTCAGTTGTCCCGCCC	20	60	60,97
adeno_32_RIGHT	2	CCGTGGGACTCATTCACTGC	20	60	61,04
adeno_33_LEFT	1	CCTCCCGCAATGATTCTCCG	20	60	60,9
adeno_33_RIGHT	1	GATTTTTCCCCGGGCGGTT	19	57,89	60,9
adeno_34_LEFT	2	GCTGAACCATATGGCTCCGC	20	60	61,53
adeno_34_RIGHT	2	CGAACGGCGGATCTCAAGTC	20	60	61,16
adeno_35_LEFT	1	CGTCAGCCAGAAAGGAGACTC	21	57,14	60,5

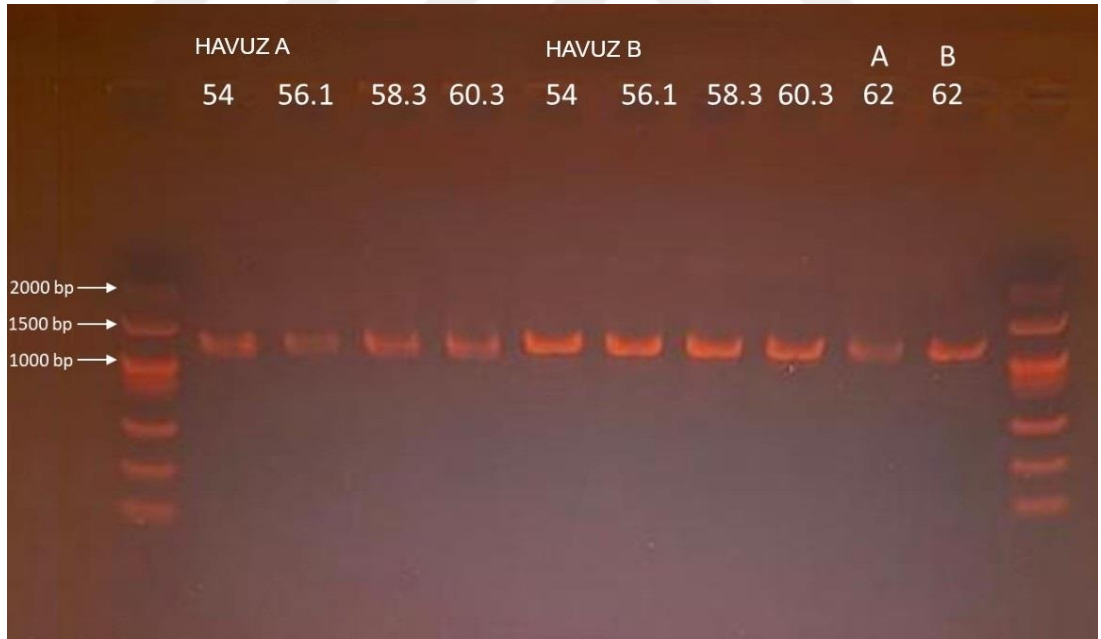
Çizelge 3.5. Devam

adeno_35_RIGHT	1	TCGGGAAGTTTCTGTCTGGACA	21	52,38	61,47
adeno_36_LEFT	2	CCTCCGGTAACAAACGTGGG	20	60	60,97
adeno_36_RIGHT	2	CCAACTCTGATTTTTCGAACTTCGT	25	40	60,65
adeno_37_LEFT	1	CTCGGAAGACTCAACACCGC	20	60	61,03
adeno_37_RIGHT	1	TGTCCATAGGGGGTGGTCG	19	63,16	60,61
adeno_38_LEFT	2	TTTCTTTAATAAAAAGCCCCACCCCC	25	40	60,37
adeno_38_RIGHT	2	AGACTAAGTCCGACAGGGGTG	21	57,14	61
adeno_39_LEFT	1	CTCAAGATGAGGAGGCGTGG	20	60	60,2
adeno_39_RIGHT	1	GCTGAGATACGCGGACACG	19	63,16	60,87
adeno_40_LEFT	2	CACCCCTGTCTGGACTTAGTCT	21	57,14	61
adeno_40_RIGHT	2	CGTTGGGACGGAGGTCAAAG	20	60	60,97
adeno_41_LEFT	1	CCGCAGACCAAAGGAACCTC	20	60	60,97
adeno_41_RIGHT	1	CGAATGACCGTGTACAGTGTGT	22	50	61,04
adeno_42_LEFT	2	GGACACGCTGTGAATCCCAG	20	60	61,04
adeno_42_RIGHT	2	CCGACAATAGAGGTGCGTGG	20	60	60,82
adeno_43_LEFT	1	GACAAGCAGAGCAGGTGCAG	20	60	61,59
adeno_43_RIGHT	1	CGAGACAGACACAGGACACG	20	60	60,4
adeno_44_LEFT	2	ACCTATGCCCTTCTTCCGCT	20	55	61
adeno_44_RIGHT	2	ACTTAAAATACACTCCCCCACACC	24	45,83	60,83

Çalışmada tüm genom dizileme işlemi için hazırlanan primerlerin genom üzerinde bulunduğu konum ve üst üste binme bölgeleri Şekil 3.5.'de gösterilmiştir. Tasarlanan primerler ve belirlenen sıcaklıklarla gerçekleştirilen gradient PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 3.6.'de verilmiştir. Jel görüntüsü incelendiğinde 58,3°C ve 60,3°C'de alınan bantlar iki primer havuzu için en ideal performansta olarak görüldüğünden bu iki sıcaklıktaki ampliconlar dizilendi.



Şekil 3.5. Tasarlanan primerlerin genom üzerinde bulunduğu konum ve üst üste binme bölgelerinin gösterilmesi



Şekil 3.6. Gradient PCR sonrası elde edilen ampliconların jel görüntüsü

Sırasıyla Marker, Havuz A 54°C, Havuz A 56,1°C, Havuz A 58,3°C, Havuz A 60,3°C, Havuz B 54°C, Havuz B 56,1°C, Havuz B 58,3°C, Havuz B 60,3°C, Havuz A 62°C, Havuz B 62°C

Bu çalışmada, *Fowl Aviadenvirus E*'nin genomik yapısının kapsamlı bir şekilde incelenmesi için *Oxford Nanopore Technologies* platformu kullanılarak toplam 57,151 dizileme sekansı elde edildi. Bu sekanslar, ortalama okuma uzunluğu 1.538.5 bp ve ortalama

okuma kalitesi 10,6 ile karakterize edildi. Medyan okuma uzunluğu 1.287.0 bç ve medyan okuma kalitesi de 10,6 olarak tespit edildi. Bu veriler, toplamda 87.926.618 bç oluşturdur.

Kalite açısından, okumaların %100'ü (57,151 okuma) Q5 kalite skorunun üzerindeydi ve bu da 87,9 Mb'lık bir veri hacmini temsil ediyordu. Q10 kalite skorunun üzerindeki okumaların oranı %64,2 (36,706 okuma) idi ve bu okumalar toplam 55,8 Mb veri oluşturdur. En yüksek ortalama baz çağrı kalitesi skorlarına sahip ilk beş okumanın uzunlukları sırasıyla 1,333; 1,438; 307; 376 ve 2,238 bç'idi. En uzun beş okuma ise sırasıyla 17,792; 17,403; 16,137; 14,770 ve 14,271 bç uzunluğundaydı ve bu okumaların ortalama baz çağrı kalitesi skorları 10,5; 8,8; 9,2; 9,9 ve 9,9 idi.

Yapılan *samtools idxstats* analizi, *sorted_sample.bam* dosyasından elde edilen verilerle gerçekleştirildi. Bu analiz sonucunda, toplam 83,632 okuma elde edildi ki bunların 57,151'i birincil okumalar ve 26,481'i tamamlayıcı okumalardı. NC_014969.1 referans genomuna 79,747 okuma başarılı bir şekilde hizalandı, bu da toplam okumaların %95,35'ine tekabül etmektedir. Bu hizalamaların içerisinde, birincil okumaların %93,20'si başarılı bir şekilde hizalandı. Ayrıca, 3,885 okuma '*' kategorisinde yer aldı, bu da hizalanamayan veya referans dışı okumaları ifade etmektedir.

Oluşturulan tüm genom dizisi ANK_UNI_WGS_Consensus olarak adlandırılmıştır. Tüm genom dizisine ait *FASTA* formatı EK-1'de sunulmuştur. Elde edilen tüm genom dizisinin GenBank'a girişi yapılarak "SUB14015087" kodlu erişim numarası onaylanmıştır.

Çalışma kapsamında oluşturulan *FASTA* formatındaki ANK_UNI_WGS_Consensus tüm genom dizisi ile farklı adenovirus izolatları ve türlerinden elde edilen 40'tan fazla tam veya kısmi genomu içeren genom seti kullanılarak *iTOL* programında görselleştirildi. Filogenetik ağaç oluşturulurken kullanılan dizilere ait bilgiler Çizelge 3.6.'da verilmiştir. Oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 3.7.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Tüm genom dizisi ile oluşturulan filogenetik ağaçta kullanılan referans dizilere ait bilgiler

Erişim numarası	Tür	Serotip	Konak	Dizi tipi	Uzunluk	Yıl	Ülke
KY968968	8b	E	Tavuk	Kısmi genom	39057 bç	2017	Çin
KT862810	8a	E	Tavuk	Tüm genom	43287 bç	2016	Japonya

Çizelge 3.6. Devam

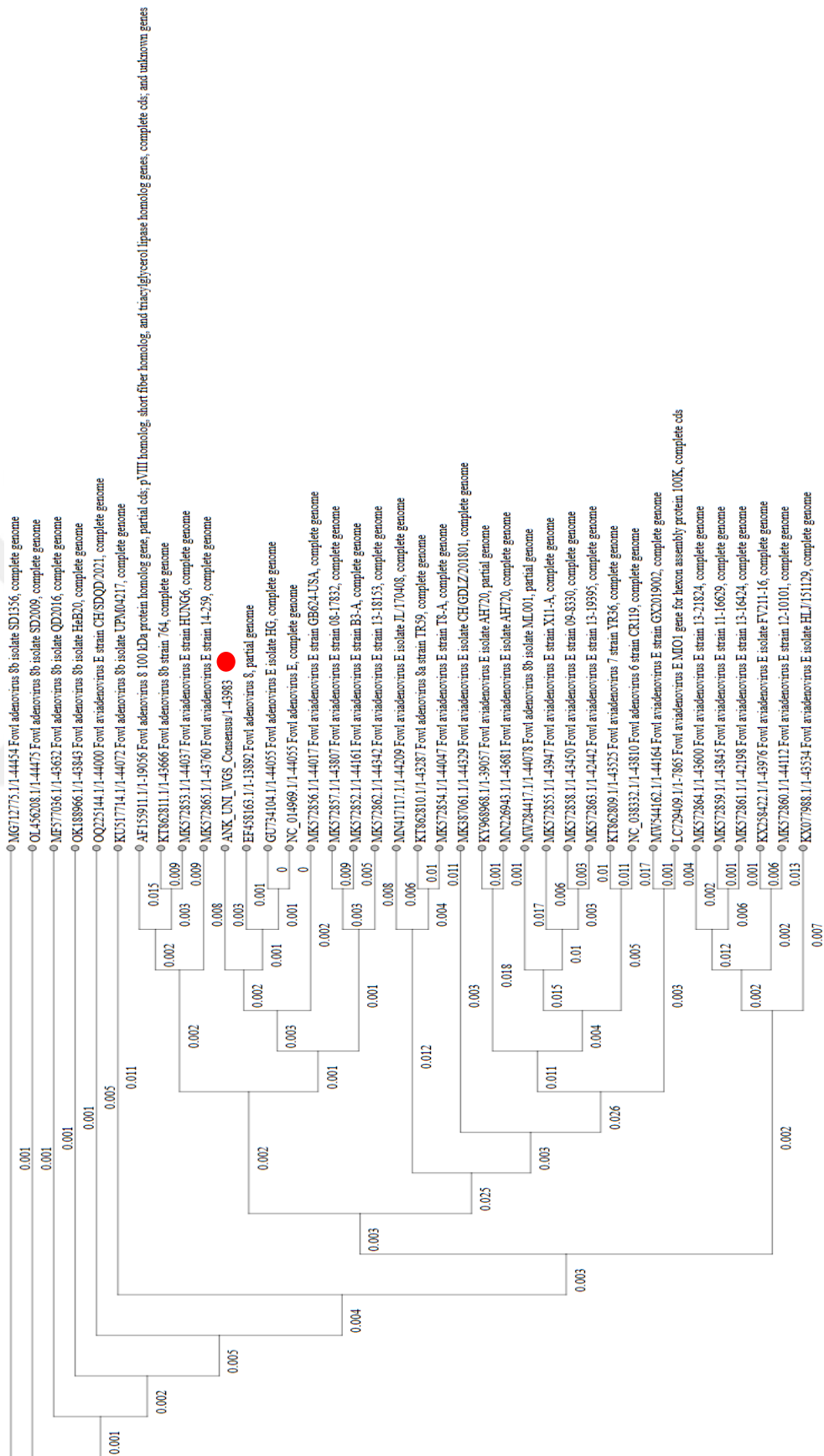
KT862809	7	E	Tavuk	Tüm genom	43525 bç	2016	Japonya
KX077988	8	E	Tavuk	Tüm genom	43534 bç	2016	Çin
MF577036	8b	E	Tavuk	Tüm genom	43632 bç	2017	Çin
KT862811	8b	E	Tavuk	Tüm genom	43666 bç	2016	Birleşik Krallık
MN226943	8b	E	Tavuk	Tüm genom	43681 bç	2019	Çin
MK572857		E	Tavuk	Tüm genom	43807 bç	2019	Fransa
NC_038332	6	E	Tavuk	Tüm genom	43810 bç	2018	Japonya
OK188966	8b	E	Tavuk	Tüm genom	43843 bç	2021	Çin
MK572859		E	Tavuk	Tüm genom	43845 bç	2019	İspanya
MK572855		E	Tavuk	Tüm genom	43947 bç	2019	ABD
KX258422		E	Tavuk	Tüm genom	43976 bç	2016	Peru
OQ225144		E	Kanatlı	Tüm genom	44000 bç	2023	Çin
MK572856		E	Tavuk	Tüm genom	44017 bç	2019	ABD
MK572853		E	Tavuk	Tüm genom	44037 bç	2019	Macaristan
MK572854		E	Tavuk	Tüm genom	44047 bç	2019	ABD
GU734104		E	Tavuk	Tüm genom	44055 bç	2010	Kanada
NC_014969		E	Tavuk	Tüm genom	44055 bç	2010	Kanada
KU517714	8b	E	Tavuk	Tüm genom	44072 bç	2016	Malezya
MK572860		E	Tavuk	Tüm genom	44112 bç	2019	Almanya
MK572852		E	Tavuk	Tüm genom	44161 bç	2019	ABD
MW544162		E	Tavuk	Tüm genom	44164 bç	2021	Çin
MN417117	8a	E	Tavuk	Tüm genom	44209 bç	2019	Çin
MK387061		E	Tavuk	Tüm genom	44329 bç	2019	Çin
MK572862		E	Tavuk	Tüm genom	44342 bç	2019	Yunanistan
MG712775	8b	E	Tavuk	Tüm genom	44454 bç	2017	Çin
OL456208	8b	E	Tavuk	Tüm genom	44475 bç	2021	Çin
MW284417	8b	E	Tavuk	Kısmi Genom	44078 bç	2020	Çin
MK572864		E	Tavuk	Tüm genom	43600 bç	2019	Fransa
MK572858		E	Tavuk	Tüm genom	43450 bç	2019	Macaristan

Çizelge 3.6. Devam

MK572865		E	Tavuk	Tüm genom	43760 bç	2019	Fransa
MK572863		E	Tavuk	Tüm genom	42442 bç	2019	Almanya
MK572861		E	Tavuk	Tüm genom	42198 bç	2019	Fransa
LC729409		E	Tavuk	Kısmi Genom	7865 bç	2022	Irak
AF155911	8	E	CFA40	Kısmi Genom	19056 bç	1999	Avustralya
EF458163	8	E	Saha izolatı	Kısmi Genom	13892 bç	2007	Kanada

Yapılan tüm genom dizileme sonucu elde edilen ANK_UNI_WGS_Consensus dizisi ile GenBank'tan seçilen FAdV-E dizileri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç sonucunda GU734104, NC_014969 ve EF458163 erişim numaralı nüklotit dizileri ile en yüksek homolojiye sahip olduğu görüldü.

Şekil 3.7. Çalışma kapsamında oluşturulan ANK_UNI_WGS_Consensus genomu ve seçilen genom seti ile çizilmiş filogenetik ağaç



Kırmızı nokta ANK_UNI_WGS_Consensus tüm genom dizisini belirtmektedir.

4. TARTIŞMA

Kanatlı adenovirüsleri her yaştan kanatlı hayvanı etkileyebildiği, immünsupresyona yol açmaları hem vertikal hem de horizontal olarak bulaşabilmeleri, değişken mortalite ve morbiditeye sahip hastalıklara neden olmaları nedeniyle kanatlı yetiştiriciliğinde dikkat çekici viral etkenlerden biridir. Kanatlı adenovirüsleri içerisinde yer alan *Fowl Aviadenvirus* cinsi özellikle etçi piliç yetiştiriciliğinde IBH, HHS ve AGE gibi hastalıklara yol açarak önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Bertran vd., 2021; Chen vd., 2019; Lai vd., 2021; Schachner vd., 2018).

Hastalıktan etkilenen hayvanların klinik tablolarında çömelme pozisyonunda durma, tüyler karışıklık ve 48 saat içinde ölüm ya da iyileşme dikkati çeker. HHS klinik olarak IBH'a benzer ancak daha şiddetli klinik tablo ve %80'lere çıkabilen mortalite oranı görülür. Etçi piliçlerde AGE klinik olarak IBH benzeri belirgin semptomlara sebep olur ve hastalık çoğunlukla kesimhanede ortaya çıkar (Schachner vd., 2018). FAdV kaynaklı hastalıkların moleküler teşhisinde ise çoğunlukla viral yükün yoğun olduğu başta karaciğer olmak üzere böbrek, dalak, pankreas, taşlık, Fabricius kesesi ve dışkı materyalleri gibi biyolojik örnekler tercih edilmektedir (De la Torre vd., 2018; Hess, 2000; Jarjees vd., 2022). Bu tez çalışmasında, klinik olarak FAdV kaynaklı hastalıklara ilişkin genel semptomlar gözlenen kümeslerden örnekler toplandı. Moleküler teşhis için ise karaciğer, fekal-oral yolla horizontal bulaşmanın incelenebilmesi için kloakal sıvı örnekleri tercih edildi.

Etçi piliçlerde FAdV enfeksiyonlarında karaciğer nekropsi bulguları temel olarak, solgun, çabuk parçalanmış şişmiş karaciğer görüntüsü, beyaz fokal lezyonlar, ekimotik kanamalar ya da peteşilerdir (Grgić vd., 2011; Günes vd., 2012; Huang vd., 2019; Schachner vd., 2021; Steer vd., 2015). Bu tez çalışmasında, yapılan nekropsi incelemesinde bu bulgulara benzer bulgular gözlemlendi. Nekropsi sırasında karaciğerde bulgu gözlenen tüm tavuklarda pozitiflik saptandı. Nekropside bulgu gözlenen karaciğer örneklerinin kullanıldığı benzer çalışmalarda da yüksek FAdV teşhisi dikkat çekmektedir (Cizmeci vd., 2020; El-Basrey vd., 2020; Niu vd., 2018).

Bu tez çalışmasında, iki ayrı yetiştirme döneminde kümeslerin (24/80) %30'unda üç ayrı örnekleme gününün en az birinde pozitiflik saptandı. Aşısız kümeslerin (20/40) %50'si aşılanmış kümeslerin ise (4/40) %10'u FAdV pozitif olduğu görüldü. Aynı kümeslere farklı yetiştirme döneminde giren farklı sürülerde de pozitiflik saptanması kümeslerden sürüye

horizontal bulaş olasılığını güçlendirmektedir. Vertikal bulaşma FAdV epidemiyolojisi için önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (Hosseini ve Morshed, 2012; Schachner vd., 2018). Bu tez çalışmasında, damızlık hattı aşıl原因an etçi piliç sürülerinde, damızlık hattı aşıl原因mayan sürülere göre çok daha düşük FAdV pozitiflik saptanma oranı görüldü. Gupta ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışmada damızlık hatlarında yapılan aşıl原因malar ile yavru hattının maternal antikorlar sayesinde yüksek oranda FAdV etkenlerine karşı immunize edilebildiği görülmüştür (Gupta vd., 2018). Bununla birlikte Ugwu ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada damızlık hattına ve yavru sürülerine FAdV 8b ve FAdV 11 bivalan inaktif aşı uygulaması sonucu hayatta kalma oranının yükseldiği ve yavru hattına maternal antikorlar ile kısmi koruma sağladığı bildirilmiştir (Ugwu vd., 2022). FAdV serotipleri arasında çapraz koruma oranının düşük olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Alvarado vd., 2007; P. A. Steer-Cope vd., 2019). Bu nedenle sahada dolaşımda olan serotiplerin belirlenmesi koruma ve kontrol çalışmalarında aşıl原因ma ile koruyuculuğun artırılması için önemlidir (Grgić vd., 2006; Hess, 2019). Bu tez çalışmasında, damızlıkları aşıl原因mış sürülerde yapılan çalışmalara benzer olarak daha düşük FAdV pozitifliği saptanmıştır. Bu durum damızlık hattı aşıl原因lanan sürülerin maternal antikorlar sayesinde ilk haftalık yaşlara kadar korunabileceğini desteklemektedir. Tez çalışmasında hem aşıllı hem de aşısız kümes gruplarından birinci günde toplanan karaciğer örneklerinden yapılan PCR sonucu hiçbir pozitiflik saptanmamıştır. Aşıllı grup için bu durum maternal antikorlar ile açıklanabilir. Aşısız grupta birinci günde pozitiflik saptanmayan kümeslerde 14 ve/veya 28'inci günlerde pozitiflik saptandı. Cizmecigil ve arkadaşları 2020 yılında yayınladıkları çalışmasında FAdV nedenli mortalitenin 8'inci günde başlayıp 16'ıncı günde pik yaptıktan sonra kademeli olarak düşerek 24 günlük yaşta normal düzeye ulaştığını bildirmiştir (Cizmecigil vd., 2020). FAdV kaynaklı hastalıklar kanatlılarda her yaş grubunda görülebildiği ancak kümes hayvanlarında daha çok genç hayvanların duyarlı olduğu ve etçi piliçlerde çoğunlukla 2-7 haftalık yaşlarda ortaya çıktığı bildirilmiştir (Cizmecigil vd., 2020; Kiss vd., 2021; Şahindokuyucu vd., 2020). Bu tez çalışmasında her iki kümes grubunda da en erken iki haftalık yaşta (14'üncü gün) pozitiflik saptanması bu görüşleri desteklemektedir.

Bu tez çalışmasında, yapılan filogenetik analizler sonucu PCR ile FAdV pozitif olarak teşhis edilen örneklerin tümünün FAdV-8b serotipine ait olduğu görüldü. Dünya genelinde yapılan çeşitli çalışmalarda FAdV-8b serotipinin IBH olgularından sıklıkla izole edildiği bildirilmiştir (Gupta vd., 2018; Morshed vd., 2017; Şahindokuyucu vd., 2020). Etçi tavuklarda IBH olgularından bildirilen serotipler çoğunlukla FAdV-2, -11, -8a ve -8b

serotipleridir (Schachner vd., 2021). Ferrando ve arkadaşlarının 2017 yılında yayınlanan çalışmasında İspanya’da çıkan IBH salgınından %82,2 oranında FAdV-8b serotipinin sorumlu olduğu bildirilmiştir (Oliver-Ferrando vd., 2017). Benzer olarak Yunanistan’da yapılan bir çalışmada da IBH olgularından yüksek oranda FAdV-8b serotipinin izole edildiği bildirilmiştir (Tsiouris vd., 2022). Slovenya’da Zadravec ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da yine IBH salgınından moleküler olarak teşhis edilen serotipin FAdV-8b olduğu bildirilmiştir (Zadravec vd., 2013). Güney Kore’de 2007-2021 yılları arasında özellikle son üç yılda (2019, 2020 ve 2021) FAdV kaynaklı hastalıklardan en fazla 8b serotipinin teşhis edildiği bildirilmiştir (Mo, 2021).

Türkiye’de ise FAdV kaynaklı hastalıklar üzerine yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Cizmecigil vd., 2020; Şahindokuyucu vd., 2020). Cizmecigil ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı çalışmada etçi piliçlerden izole edilen FAdV suşlarının yapılan filogenetik analizler sonucunda Mısır (2019), Brezilya (2018), İran (2015), İtalya (2007), Rusya (1997), Pakistan (1989) ve Avustralya (1986) dahil olmak üzere dünyanın farklı ülkelerinde şimdiye kadar bildirilen diğer FAdV suşları ile farklı bir küme oluşturduğu bildirilmiştir (Cizmecigil vd., 2020). Bu tez çalışmasında, filogenetik analizler sonucu bulunan tüm pozitifliklerin birbiriyle %100 homoloji gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca Endonezya orijinli MK692992 GenBank erişim kodlu FAdV-8b genotipi ile %100 homoloji gösterdiği bulundu. Cizmecigil ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan çalışmada FAdV-8b’nin bu tez çalışmasına paralel olarak IBH vakalarında en sık izole edilen serotip olduğu ve Endonezya orijinli MK692992 erişim kodlu hekson gen bölgesi dizisiyle %99,48 benzerlik saptandığı bildirilmiştir. Şahindokuyucu ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınlanan çalışmasında Ege Bölgesinde dolaşımda olan baskın serotiplerin FAdV-8b ve FAdV-11 olduğu bildirmiştir (Şahindokuyucu vd., 2020). Bu tez çalışmasında teşhis edilen FAdV-8b hekson gen bölgeleri ile Şahindokuyucu ve arkadaşlarının etçi piliçlerde IBH olgularından teşhis ettiği FAdV-8b ve FAdV-11 hekson gen bölgesi dizilerinin filogenetik analizi gerçekleştirildi. Bu çalışmada elde edilen FAdV-8b serotipleri ile Şahindokuyucu ve arkadaşlarının çalışmasında (Şahindokuyucu vd., 2020) bildirilen FAdV-8b serotipleri arasında sırasıyla; GenBank erişim numaraları MK937073, MK937075, MK937074 olan dizilerle %99,82, MK937071 ve MK937076 olan dizilerle ise %96,72 homoloji saptandı. Yine aynı çalışmada bildirilen FAdV-11 serotipi ile %58,48 homoloji saptandı. Bu tez çalışmasında moleküler identifikasyonu yapılan FAdV-8b serotiplerinin daha önce Türkiye’de dolaşımda olduğu belirlenen FAdV-8b’lerle yüksek benzerlik gösterdiği görüldü.

Vertikal ve horizontal bulaşma FAdV'lerin primer bulaşma yolları olarak kabul edilir. FAdV'lerin dışkıda yüksek titrelere bulunduğunu gösteren deneysel çalışmalar bulunmaktadır (Naguib vd., 2021; Radwan vd., 2019). Bu durum fekal-oral yolla horizontal bulaşmanın kolaylıkla gerçekleşebildiğini desteklemektedir. Bu tez çalışmasında hem karaciğer hem de kloakal sıvı örneklerinden tanımlanmış FAdV-8b serotipinin birbirleriyle %100 homolojiye sahip olması horizontal bulaşmanın fekal-oral yolla geliştiğini destekler niteliktedir. Lebdah ve arkadaşlarının farklı yollarla enfekte edilen kuşlarla yürüttüğü deneysel çalışmada klinik semptomlar göstermeyen kuşlardan da dışkı ile saçılımın olabildiği bildirilmiştir (Lebdah vd., 2022). Bunun yanı sıra Huang ve arkadaşlarının çalışmasında da FAdV ile deneysel olarak enfekte edilen kuşların hem KC hem de KS örneklerinden pozitiflik saptandığı bildirilmiştir (Huang vd., 2019). Naguib ve arkadaşlarının 2021 yılında yayınladıkları çalışmasında kümeslerden toplanan örneklerde yalnızca üç karaciğer örneğinden pozitiflik saptandığı ve kloakal sıvı örneklerinden ise yedi pozitiflik saptandığı bildirilmiştir (Naguib vd., 2021). Bu çalışmaya göre kloakal sıvı örnekleri FAdV teşhisinde karaciğer örneklerine göre daha verimli olarak sunulmuştur. Ancak FAdV'lerin patojen olmayan suşlarının varlığı bilinmektedir (Absalón vd., 2017; Niczyporuk, 2016). Grgić ve arkadaşları 2011 yılında yayınladıkları çalışmalarında aşılama sonrası dışkı ile saçılımın olduğunu bildirmiştir (Grgić vd., 2011). Bu nedenle bu tez çalışmasında FAdV hastalık şüpheli hayvanlardan elde edilen pozitifliklerin patojen olmayan ve/veya aşılama kaynaklı oluşabilecek pozitifliklerle karışmasını engellemek için sadece karaciğer örneklerinden pozitif çıkan etçi piliçlerde kloakal saçılım incelenmiştir.

Tez çalışmasında NC_014969.1 numaralı referans genomuna başarılı bir şekilde hizalanan dizileme verileri, *Fowl Aviadenovirus* E'nin genetik çeşitliliğine dair kapsamlı bilgiler sunmuştur. Özellikle, elde edilen konsensus genom, virusun genetik yapısının daha derinlemesine anlaşılmasını sağlamıştır. Bu çalışmada, FAdV'lerin filogenetik yapısını anlamak için geniş bir genom seti kullanılmıştır. Bu set, farklı adenovirus izolatları ve türlerinden elde edilen 40'tan fazla tam veya kısmi genomu içermektedir. Bu genetik diziler, *Fowl Aviadenovirus* E ve onun çeşitli alt türlerine ait izolatları kapsamakta ve genetik çeşitliliğin derinlemesine analizi için zengin bir kaynak sağlamaktadır. Kullanılan genomlar arasında, tam genomu sahip izolatlar (örneğin, KY968968.1, KT862810.1, KX077988.1) ve belirli gen bölgelerine odaklanan kısmi genomlar (örneğin, LC729409.1, AF155911.1, EF458163.1) bulunmaktadır.

Oluşturulan filogenetik ağaç, bu tez çalışmasında elde edilen “SUB14015087” erişim numaralı FAdV-8b genotipi ile GU734104 (Grgić vd., 2011), NC_014969 (Grgić vd., 2011) ve EF458163 (Corredor vd., 2008) erişim numaralı nükleotit dizileri arasında en yüksek homoloji oranına sahip olduğunu gösterdi. Bahsi geçen üç dizinin de Kanada orijinli olduğu bildirilmiştir (Corredor vd., 2008; Grgić vd., 2011). Bu durum coğrafi bölgelerde dolaşımda olan serotiplerin genotipik olarak birbirine yakın olma olasılığının daha yüksek olduğunu gösterir niteliktedir. Corredor ve arkadaşlarının (2008) bildirdiği EF458163 erişim numaralı hekson gen bölgesi kısmi gen dizisinin Grgić ve arkadaşlarının 2011 yılında bildirdiği GU734104 ve NC_014969 erişim kodlu tüm genom dizileri ile yakın genomik benzerlik göstermesi hekson gen bölgesinin genotiplendirmede önemli bir bölge olduğunu desteklemektedir (Corredor vd., 2008; Grgić vd., 2011; Hosseini ve Morshed, 2012; Izquierdo-Lara vd., 2016; Lai vd., 2021; Li vd., 2018; Naguib vd., 2021). Türkiye’den daha önce bildirilmiş FAdV tüm genom dizisi bulunmamaktadır. FAdV’lerin moleküler epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılması için bu yönde çalışmalara devam edilmesi önem taşımaktadır.

Yapılan geniş ölçekli filogenetik analiz, FAdV’nin genetik çeşitliliği ve evrimsel tarihini daha iyi anlamamıza yardımcı olmuştur. Elde edilen bulgular, adenovirusların sınıflandırılması, enfeksiyon mekanizmalarının anlaşılması ve bu virusların evrimsel adaptasyonlarının incelenmesi için önemli bir temel teşkil etmektedir. Bu analizler, adenovirus araştırmalarında ve hastalık kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde kritik rol oynamaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kümes hayvanları yetiştiriciliğinde tüm dünyada oldukça yaygın olarak bildirilen FAdV etkenlerinin epidemiyolojik özellikleri cins ve serotipler bazında farklılık göstermektedir. Farklı hastalıklara neden olan FAdV serotiplerinin coğrafi dağılımlarının ve dolaşımında olan genotiplerin belirlenmesi koruma ve kontrol çalışmalarının etkin bir şekilde yürütülebilmesi için önem taşımaktadır. Bu nedenle serotip bazında yürütülen moleküler epidemiyoloji çalışmaları FAdV'lerin neden olduğu ekonomik kayıpların önüne geçilmesinde ön koşul olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu tez çalışmasında FAdV teşhisinin aşıli damızlıkların yavru hatlarında aşısız damızlıkların yavru hatlarına göre daha az olduğu belirlendi. Bu durum vertikal bulaşmanın ve damızlık hattının aşılmasının FAdV kaynaklı hastalıklardan korunmada önemini ve aşı çalışmalarının dolaşımında olan yeni genotiplerin sürekli izlenmesi ve moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesiyle daha verimli yürütülebileceğini düşündürdü. Türkiye’de daha önce bildirilen sirkülasyonda olan serotiplerle benzer olarak bu tez çalışmasında da baskın serotipin FAdV-8b olduğu görüldü. Ancak yapılan filogenetik analizler doğrultusunda önemli bir virülens ve patojenite bölgesi olan hekzon gen bölgesinde heterojeniteler belirlenmiştir. Bu durum serotipler arası ve hatta serotip içerisindeki ufak heterojenitelerin aşılama ile koruma verimini düşürme ihtimali nedeniyle moleküler epidemiyoloji çalışmalarının düzenli olarak yürütülmesi gerekliliğini vurgulamaktadır. Bu tez çalışmasında Türkiye’den ilk defa bir FAdV etkeninin tüm genom dizilemesi GenBank veri bankasına girilmiştir. Böylece FAdV etkenlerine karşı yürütülen koruma-kontrol programlarının düzenlenmesi ve bilimsel literatüre katkıda bulunması yönünden değerli bilgiler açığa çıkmıştır. FAdV'lerin bulaşma yollarının belirlenmesi, baskın serotiplerin genotiplendirilmesi ve bu genotiplerin moleküler epidemiyolojisinin ortaya konulması FAdV kökenli hastalıklarla mücadele, koruma-kontrol programları oluşturulması ve aşılama prosedürlerinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

- Absalón, A.E., Morales-Garzón, A., Vera-Hernández, P.F., Cortés-Espinosa, D.V., Uribe-Ochoa, S.M., García, L.J. & Lucio-Decanini, E. (2017). Complete genome sequence of a non-pathogenic strain of Fowl Adenovirus serotype 11: Minimal genomic differences between pathogenic and non-pathogenic viruses. *Virology*, 501(April 2016), 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.11.006>
- Alvarado, I.R., Villegas, P., El-Attrache, J., Jensen, E., Rosales, G., Perozo, F. & Purvis, L.B. (2007). Genetic characterization, pathogenicity, and protection studies with an avian adenovirus isolate associated with inclusion body hepatitis. *Avian diseases*, 51(1), 27–32. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2007\)051\[0027:GCPAPS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2007)051[0027:GCPAPS]2.0.CO;2)
- Benko, M., Aoki, K., Arnberg, N., Davison, A. J., Echavarria, M., Hess, M., Jones, M. S., Kajan, G.L., Kajon, A.E., Mittal, S.K., Podgorski, I.I., Martin, C.S., Wadell, G., Watanabe, H., & Harrach, B. (2022). ICTV Virus Taxonomy Profile: Adenoviridae 2022. *Journal of General Virology*, 103(3), 1–2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001721>
- Bertran, K., Blanco, A., Antilles, N., Nofrarías, M., Valle, R.M., Cobos, À., Ramis, A., Biarnés, M. & Majó, N. (2021). A 10-Year Retrospective Study of Inclusion Body Hepatitis in Meat-Type Chickens in Spain (2011–2021). *Viruses*, 13(11), 2170. <https://doi.org/10.3390/v13112170>
- Calnek, B.W., Shek, W.R., Menendez, N.A. & Stiube, P. (1982). Serological Cross-Reactivity of Avian Adenovirus Serotypes in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Avian Diseases*, 26(4), 897–906. <https://www.jstor.org/stable/1589878>
- Chen, L., Yin, L., Zhou, Q., Peng, P., Du, Y., Liu, L., Zhang, Y., Xue, C., & Cao, Y. (2019). Epidemiological investigation of Fowl Adenovirus infections in poultry in China during 2015–2018. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1969-7>
- Cizmecigil, U.Y., Umar, S., Yilmaz, A., Bayraktar, E., Turan, N., Tali, B., Aydin, O., Tali, H. E., Yaramanoglu, M., Yilmaz, S. G., Kolukisa, A., Sadeyen, J.R., Iqbal, M. & Yilmaz, H. (2020). Characterisation of Fowl Adenovirus (FAdV-8b) strain concerning the geographic analysis and pathological lesions associated with inclusion body hepatitis in broiler flocks in Turkey. *Journal of Veterinary Research*, 64(2), 231–237. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0026>
- Corredor, J.C., Garceac, A., Krell, P.J. & Nagy, É. (2008). Sequence comparison of the right end of Fowl Adenovirus genomes. *Virus Genes*, 36(2), 331–344. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0194-9>
- De la Torre, D.I., Nuñez, L.F., Astolfi-Ferreira, C.S. & Ferreira, A.J.P. (2018). Enteric virus diversity examined by molecular methods in Brazilian Poultry flocks. *Veterinary Sciences*, 5(2), 6–9. <https://doi.org/10.3390/vetsci5020038>
- El-Basrey, Y.F., Hamed, R.I., Mohamed, M. & LebDAH, M.A. (2020). Detection of inclusion body hepatitis virus in broilers at Sharkia province, Egypt. *Journal of Animal Health*

and Production, 9(1), 84–89. <https://doi.org/10.17582/journal.jahp/2020/9.s1.84.89>

- El-Shall, N.A., El-Hamid, H.S.A., Elkady, M.F., Ellakany, H.F., Elbestawy, A.R., Gado, A.R., Geneedy, A. M., Hasan, M. E., Jaremko, M., Selim, S., El-Tarabily, K.A. & El-Hack, M. E. A. (2022). Epidemiology, pathology, prevention, and control strategies of inclusion body hepatitis and hepatitis-hydropericardium syndrome in poultry: A comprehensive review. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.963199>
- Franzo, G., Prentza, Z., Paparounis, T., Tsiouris, V., Centonze, G., Legnardi, M., Catelli, E., Tucciarone, C. M., Koutoulis, K. & Cecchinato, M. (2020). Molecular epidemiology of Fowl Adenoviruses in Greece. *Poultry Science*, 99(11), 5983–5990. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.07.019>
- Gelderblom, H. and Maichle-Lauppe, I. (1982). The fibers of Fowl Adenoviruses. *Archives of Virology*, 72(4), 289–298. <https://doi.org/10.1007/BF01315225>
- Grafl, B., Aigner, F., Liebhart, D., Marek, A., Prokofieva, I., Bachmeier, J. & Hess, M. (2012). Vertical transmission and clinical signs in broiler breeders and broilers experiencing adenoviral gizzard erosion. *Avian Pathology*, 41(6), 599–604. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.740614>
- Grgić, H., Philippe, C., Ojkić, D. & Nagy, E. (2006). Study of vertical transmission of Fowl Adenoviruses. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 70(3), 230–233. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16850947>
- Grgić, H., Yang, D. H. & Nagy, É. (2011). Pathogenicity and complete genome sequence of a Fowl Adenovirus serotype 8 isolate. *Virus Research*, 156(1–2), 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.01.002>
- Günes, A., Marek, A., Grafl, B., Berger, E. & Hess, M. (2012). Real-time PCR assay for universal detection and quantitation of all five species of Fowl Adenoviruses (FAdV-A to FAdV-E). *Journal of Virological Methods*, 183(2), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.04.005>
- Gupta, A., Ahmed, K.A., Ayalew, L.E., Popowich, S., Kurukulasuriya, S., Goonewardene, K., Gunawardana, T., Karunarathna, R., Ojkic, D., Tikoo, S.K., Willson, P. & Gomis, S. (2017). Immunogenicity and protective efficacy of virus-like particles and recombinant fiber proteins in broiler-breeder vaccination against Fowl Adenovirus (FAdV)-8b. *Vaccine*, 35(20), 2716–2722. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.075>
- Gupta, A., Popowich, S., Ojkic, D., Kurukulasuriya, S., Chow-Lockerbie, B., Gunawardana, T., Goonewardene, K., Karunarathna, R., Ayalew, L.E., Ahmed, K.A., Tikoo, S.K., Willson, P. & Gomis, S. (2018). Inactivated and live bivalent Fowl Adenovirus (FAdV8b + FAdV11) breeder vaccines provide broad-spectrum protection in chicks against inclusion body hepatitis (IBH). *Vaccine*, 36(5), 744–750. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.047>
- Hafez, H.M. (2011). Enteric diseases of poultry with special attention to *Clostridium perfringens*. *Pakistan Veterinary Journal*, 31(3), 175–184.

- Hess. (2019). 14th edition: Diseases of poultry. İçinde DE. Swayne, M. Boulianne, C.M. Logue, L.R. McDougald, V. Nair, D. L. Suarez, S. Wit, T. Grimes, D. Johnson, M. Kromm, T.Y. Prajitno, I. Rubinoff & G. Zavala (Ed.), *Diseases of Poultry*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119371199>
- Hess, M. (2000). Detection and Differentiation of Avian Adenoviruses: A review. *Avian Pathology*, 29(3), 195–206. <https://doi.org/10.1080/03079450050045440>
- Hosseini, H. & Morshed, R. (2012). Molecular Identification of Fowl Adenovirus Associated with Inclusion Body Hepatitis in Iran. *Iranian Journal of Virology*, 6(4), 7–12. <https://doi.org/10.21859/isv.6.4.7>
- Huang, Q., Ma, X., Huang, X., Huang, Y., Yang, S., Zhang, L., Cui, N. & Xu, C. (2019). Pathogenicity and complete genome sequence of a Fowl Adenovirus serotype 8b isolate from China. *Poultry Science*, 98(2), 573–580. <https://doi.org/10.3382/ps/pey425>
- Izquierdo-Lara, R., Calderón, K., Chumbe, A., Montesinos, R., Montalván, Á., González, A. E., Icochea, E. & Fernández-Díaz, M. (2016). Complete genome sequence of Fowl Aviadenovirus serotype 8b isolated in South America. *Genome Announcements*, 4(5), 2009–2010. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01174-16>
- Jarjees, M.T., Jwher, D.M. & Shareef, A.M. (2022). Studying an outbreak of inclusion body hepatitis in broilers in Nineveh governorate, Iraq. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 36(3), 769–774. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2022.131932.2024>
- Kaján, G.L. (2016). Molecular Detection of Animal Viral Pathogens. İçinde D. Liu (Ed.), *Molecular Detection of Animal Viral Pathogens* (ss. 735–743). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19719>
- Kim, M.S., Lim, T.H., Lee, D.H., Youn, H.N., Yuk, S.S., Kim, B.Y., Choi, S.W., Jung, C.H., Han, J.H. & Song, C.S. (2014). An inactivated oil-emulsion Fowl Adenovirus serotype 4 vaccine provides broad cross-protection against various serotypes of Fowl Adenovirus. *Vaccine*, 32(28), 3564–3568. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.015>
- Kiss, I., Homonnay, Z.G., Mató, T., Bányai, K. & Palya, V. (2021). Research Note: An overview on distribution of Fowl Adenoviruses. *Poultry Science*, 100(5), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101052>
- Lai, V.D., Min, K., Lai, H.T.L. & Mo, J. (2021). Epidemiology of Fowl Adenovirus (FAdV) infections in South Korean chickens during 2013–2019 following introduction of FAdV-4 vaccines. *Avian Pathology*, 50(2), 182–189. <https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1872766>
- Lebdah, M., Alshaya, D.S., Jalal, A.S., Mousa, M.R., Radwan, M.M., Samir, M., Adel, A., Albaqami, N.M., El-Saadony, M.T., El-Tarabily, K.A. & El basrey, Y.F.H. (2022). Molecular characterization of Aviadenovirus serotypes and pathogenicity of the identified adenovirus in broiler chickens. *Poultry Science*, 101(12), 101918. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101918>
- Li, L., Wang, J., Chen, P., Zhang, S., Sun, J. & Yuan, W. (2018). Pathogenicity and molecular

characterization of a Fowl Adenovirus 4 isolated from chicken associated with IBH and HPS in China. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1733-4>

Li, P.H., Zheng, P.P., Zhang, T.F., Wen, G.Y., Shao, H.B. & Luo, Q.P. (2017). Fowl Adenovirus serotype 4: Epidemiology, pathogenesis, diagnostic detection, and vaccine strategies. *Poultry Science*, 96(8), 2630–2640. <https://doi.org/10.3382/ps/pex087>

MacLachlan, N.J. and Dubovi, E.J. (2016). Fenner ' s Veterinary Virology. İçinde Stephen W. Barthold; David E. Swayne; James R. Winton (Ed.), Elsevier (5. baskı). Sara Tenney. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2013-0-06921-6>

Malik, Y.S., Verma, A.K., Kumar, N., Touil, N., Karthik, K., Tiwari, R., Bora, D.P., Dhama, K., Ghosh, S., Hemida, M.G., Abdel-Moneim, A.S., Bányaı, K., Vlasova, A.N., Kobayashi, N. & Singh, R.K. (2019). Advances in Diagnostic Approaches for Viral Etiologies of Diarrhea: From the Lab to the Field. *Frontiers in Microbiology*, 10(September), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01957>

Marek, A., Günes, A., Schulz, E. & Hess, M. (2010). Classification of Fowl Adenoviruses by use of phylogenetic analysis and high-resolution melting-curve analysis of the hexon L1 gene region. *Journal of Virological Methods*, 170(1–2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.09.019>

Marek, A., Kaján, G.L., Kosiol, C., Benkő, M., Schachner, A. & Hess, M. (2016). Genetic diversity of species Fowl Aviadenovirus d and Fowl Aviadenovirus E. *Journal of General Virology*, 97(9), 2323–2332. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000519>

Mirzazadeh, A., Grafl, B., Berger, E., Schachner, A. & Hess, M. (2021). Longitudinal Serological Monitoring of Commercial Broiler Breeders for Fowl Adenoviruses (FAdVs)-Presence of Antibodies Is Linked with Virus Excretion. *Avian Diseases*, 65(1), 177–187. <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-20-00107>

Mo, J. (2021). Historical Investigation of Fowl Adenovirus Outbreaks in South Korea from 2007 to 2021: A Comprehensive Review. *Viruses*, 13(11), 2256. <https://doi.org/10.3390/v13112256>

Morshed, R., Hosseini, H., Langeroudi, A.G., Fard, M.H.B. & Charkhkar, S. (2017). Fowl Adenoviruses D and e Cause Inclusion Body Hepatitis Outbreaks in Broiler and Broiler Breeder Pullet Flocks. *Avian Diseases*, 61(2), 205–210. <https://doi.org/10.1637/11551-120516-Reg.1>

Naguib, M.G.A., Morsy, E.A., Samir, M., Khattab, M.S., Khelfa, D.G. & Abdel-Alim, G. A. (2021). Isolation and Molecular Characterization of Fowl Adenoviruses Associated with Inclusion Body Hepatitis-hydropericardium Syndrome in Broiler Chickens in Egypt. *World's Veterinary Journal*, 11(3), 333–342. <https://doi.org/10.54203/scil.2021.wvj46>

Niczyporuk, J.S. (2016). Phylogenetic and geographic analysis of Fowl Adenovirus field strains isolated from poultry in Poland. *Archives of Virology*, 161(1), 33–42. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2635-4>

- Niu, Y., Sun, Q., Zhang, G., Sun, W., Liu, X., Xiao, Y., Shang, Y. & Liu, S. (2018). Epidemiological investigation of outbreaks of Fowl Adenovirus infections in commercial chickens in China. *Transboundary and emerging diseases*, 65(1), e121–e126. <https://doi.org/10.1111/tbed.12691>
- Oliver-Ferrando, S., Dolz, R., Calderón, C., Valle, R., Rivas, R., Pérez, M., Biarnés, M., Blanco, A., Bertran, K., Ramis, A., Busquets, N. & Majó, N. (2017). Epidemiological and pathological investigation of Fowl Aviadenovirus serotypes 8b and 11 isolated from chickens with inclusion body hepatitis in Spain (2011–2013). *Avian Pathology*, 46(2), 157–165. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1232477>
- Pan, Q., Wang, J., Gao, Y., Cui, H., Liu, C., Qi, X., Zhang, Y., Wang, Y., Li, K., Gao, L. & Wang, X. (2020). Development and application of a novel ELISA for detecting antibodies against group I Fowl Adenoviruses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(2), 853–859. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10208-3>
- Philippe, C., Grgić, H., Ojkić, D. & Nagy, É. (2007). Serologic monitoring of a broiler breeder flock previously affected by inclusion body hepatitis and testing of the progeny for vertical transmission of Fowl Adenoviruses. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 71(2), 98–102.
- Radwan, M.M., El-Deeb, A.H., Mousa, M.R., El-Sanousi, A.A. & Shalaby, M.A. (2019). First report of Fowl Adenovirus 8a from commercial broiler chickens in Egypt: Molecular characterization and pathogenicity. *Poultry Science*, 98(1), 97–104. <https://doi.org/10.3382/ps/pey314>
- Şahindokuyucu, İ., Çöven, F., Kılıç, H., Yılmaz, Ö., Kars, M., Yazıcıoğlu, Ö., Ertunç, E. & Yazıcı, Z. (2020). First report of Fowl Aviadenovirus serotypes FAdV-8b and FAdV-11 associated with inclusion body hepatitis in commercial broiler and broiler-breeder flocks in Turkey. *Archives of Virology*, 165(1), 43–51. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04449-w>
- Şahindokuyucu, I. and Yazıcı, Z. (2019). Kanatlı Hayvanlarda Adenovirus Enfeksiyonlarına Genel Bakı ş : Fowl Aviadenovirus Enfeksiyonları. *Turkish Veterinary Journal*, 1(1), 30–41.
- Schachner, A., Grafl, B. & Hess, M. (2021). Spotlight on avian pathology: Fowl Adenovirus (FAdV) in chickens and beyond—an unresolved host-pathogen interplay. *Avian Pathology*, 50(1), 2–5. <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1810629>
- Schachner, A., Marek, A., Grafl, B. & Hess, M. (2016). Detailed molecular analyses of the hexon loop-1 and fibers of Fowl Aviadenoviruses reveal new insights into the antigenic relationship and confirm that specific genotypes are involved in field outbreaks of inclusion body hepatitis. *Veterinary Microbiology*, 186, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.02.008>
- Schachner, A., Matos, M., Grafl, B. & Hess, M. (2018). Fowl Adenovirus-induced diseases and strategies for their control—a review on the current global situation. *Avian Pathology*, 47(2), 111–126. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1385724>

- Steer-Cope, P., Sandy, J., O'Rourke, D., Scott, P., Browning, G. & Noormohammadi, A. (2017). Chronologic Analysis of Gross and Histologic Lesions Induced by Field Strains of FAdV-1, FAdV-8b, and FAdV-11 in Six-Week-Old Chickens. *Avian Diseases*, 61(4), 512–519. <https://doi.org/10.1637/11718-072317-Reg.1>
- Steer-Cope, P.A., Sandy, J.R., O'Rourke, D., Scott, P.C., Browning, G.F. & Noormohammadi, A.H. (2019). Vaccination with FAdV-8a induces protection against inclusion body hepatitis caused by homologous and heterologous strains. *Avian Pathology*, 48(5), 396–405. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1612032>
- Steer, P.A., Kirkpatrick, N.C., O'Rourke, D. & Noormohammadi, A.H. (2009). Classification of Fowl Adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of the hexon gene region. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(2), 311–321. <https://doi.org/10.1128/JCM.01567-08>
- Steer, P.A., Sandy, J.R., O'Rourke, D., Scott, P.C., Browning, G.F. & Noormohammadi, A.H. (2015). Chronological analysis of gross and histological lesions induced by field strains of Fowl Adenovirus serotypes 1, 8b and 11 in one-day-old chickens. *Avian Pathology*, 44(2), 106–113. <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1007919>
- Tsiouris, V., Mantzios, T., Kiskinis, K., Guérin, J.L., Croville, G., Brellou, G.D., Apostolopoulou, E.P., Petridou, E.J. & Georgopoulou, I. (2022). First Detection and Identification of FAdV-8b as the Causative Agent of an Outbreak of Inclusion Body Hepatitis in a Commercial Broiler Farm in Greece. *Veterinary Sciences*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/vetsci9040160>
- Ugwu, C.C., Hair-Bejo, M., Nurulfiza, M.I., Omar, A.R. & Ideris, A. (2022). Efficacy, humoral, and cell-mediated immune response of inactivated Fowl Adenovirus 8b propagated in chicken embryo liver cells using bioreactor in broiler chickens. *Veterinary World*, 15(11), 2681–2692. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2681-2692>
- Zadravec, M., Slavec, B., Krapež, U., Kaján, G.L., Račnik, J., Juntos, P., Juršič Cizerl, R., Benkő, M. & Zorman Rojs, O. (2013). Inclusion body hepatitis (IBH) outbreak associated with Fowl Adenovirus type 8b in broilers. *Acta Veterinaria*, 63(1), 101–110. <https://doi.org/10.2298/AVB1301101Z>
- Zhang, Y., Liu, R., Tian, K., Wang, Z., Yang, X., Gao, D., Zhang, Y., Fu, J., Wang, H. & Zhao, J. (2018). Fiber2 and hexon genes are closely associated with the virulence of the emerging and highly pathogenic Fowl Adenovirus 4. *Emerging Microbes and Infections*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0203-1>
- Zhuang, Q., Wang, S., Zhang, F., Zhao, C., Chen, Q., Zhao, R., Guo, P., Ju, L., Li, J., Hou, G., Chen, X., Sun, F. & Wang, K. (2023). Molecular epidemiology analysis of Fowl Adenovirus detected from apparently healthy birds in eastern China. *BMC veterinary research*, 19(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03545-5>

EKLER

EK-1

> ANK_UNI_WGS_Consensus_region [1 45995]

CATCATCTATATATATCTACTTAAAATACACTCCCCACACCCCCTATTCCCGCCGCCGCC
GGCAGAGGGCACCCGCACCAAACAAATGAAAAATGGGTGGAGTGAATGACAGGGCGTT
TTCGGCACGCCCCGACCGGGGCGTGCCTTGAGCGCGACTTTCGGTCGCCAGATGGCGTCA
TTGCGTGTGTTTTTCGTGACTCAAAGTCGTAAATGCTATCTAAATGACCGGGGCGCGGTTT
TAATGAGCGTGTTTTTTAGTGCGGTTTTCCGTCCTTGACTTTTGTACCGCAATTTCCGCGTT
TGCACACACCCGGGCGGAGCACGTATCTAGTTTTTAATTTTGCACGCTATGTACGGAATGC
GGATCAGTGTACCGGAACGGACAATTAAGTCGTAAAAACTTCCTCGTGGTACCTGAATCA
TCGGTTTTACAGTGCCACGCACGCCAATTCCACGTGGACTTTGCTCGGGAGCGGTGTTAT
TTTCGGGCCAGTCAGGAGGCGGTAAACAGACTTTATGGCGGGTCCGCACCGTATAACTGT
GGAGCGAGCGATCTTCAGGGCACGGATGAGCGAGGAGACGGGCTCCGCTCCACAACCTCC
ATCCGTCGCTCCTGGTCGTCCGCGTCGATCCGGTGCCGACCTCCGGTTTTCGTGCTCGATTT
GCGTCGCTTGCTCGGATTCCCGANACATCTTTCTCCATAACTTGCCGAACGGTCCTTGG
ACGGAGTCGATTTGGTACGGCTCCATCACCCAGAGGGAAGTGAACCGGGGCGCTGGAGGC
GATCGTGGAGGAGCTCTAGGTAATTTTTCCCCCTTTTCCTGTAGGTAATCCGAAGATGTC
TGTCGATTCCGGCTGCCCCCTGACACCCCCGGTAAAGCTGCTGTACCAGCGTCACTCACC
GTTTGCGATAGCGCCGGCGAAGGCGACGTCCGGCTCTGCCGGTTACGACCTGTTACGCGC
CGCTGANGTGGTGGTCCCGCCACGCAGCAGGGCGTTGATTCCCACGGATCTGTCTTTCCA
GTTTCCCCGCGGTGTTTACGGCCGCATCGCCCCTCGTTCGGGCCTGGCCGTCAAGTTTTTT
ATAGACGTGGGTGCCGGGGTGGTGGATAGCGATTACCGCGGCATCGTGTCCGGTGTCTGCT
GTTTAACTTTTCGGAGCACAAATTTTAACTGCGCCGAGGTGACCGCATCGCCAGATGAT
TTTGAGCGTCACCTACCCCCGATCTGGAAGAGCGCTTCGCTCTCGATCAGACGGAACG
CGGCTCCGGGGGTTTTCGGGTCCACGGGTGGGTTTTAGATCTGGGATTTGTCCCTTTTTGT
AGGAGCTGTCAGAGAACAGCGAGGCTCCGGACGAGGTTGACTTTGTGGTGAATTGGCC
GCGGCGCTCGAGGCAGATAACGAGGCCTCTGCCGGCTGCTTCTGCGAAGCCGATTCTTGG
GAAAAGCACCTGTTCTCTGTGCTCTTGGAGCCCCTGTACAATTCTCTAGGTATGATTGTCT
CTCTTTGGACCCTCGTTGTAGAAGTGGTAAACGCGTGCGGATCGGTGGTGGGTCGTCCGG
CTTACCGCTATTACGTGGACCGCGATCTGCTGTTGCAAGTGCATGAGAGTCTGCGCAACG
CCTTGGAGAAGACGATTGGCGTTGGCAATGGTCTCGCCCGGATCGGAGACGGAGAAAAC
CGCAGATTCTGAGAAGCGCAGTGAAGTACGCAATGGGTCCCGACGATCTGTTTGTGGCTCT
TCTCGCGGTCTTTGCTGTACTATCTCTGCTATGGGGGTGCTTTTGGGTCTTTTGTGCGGTC
CGCCCGAGGGCGAAGCACTAGCTTACTGGGAATGGTATTGGCGAATCTGTAACGCGAGG
GTCCCTTAATAAAAATCCTATGCAAAAACCTTAACATGTGGGACTGGTTTTTTCTAGGGAG

ATGACGGGATCTCGGGAACGGTACTGGAATTGGTTGAGAGTCTGATTCGTAGAGGTAT
CGTCAGCCGCCAGCAATGGTTTTACTGCGATCGCTCAGAATACGGTTACTTTACGAAACG
GTACCGGGGTGAGAGGAACTGTCCTGCTTGTTCGGGACGTCCGCCGCCACATGTTTTG
GACCAAGTGCCTGGCCGACTACATGTTGACCGGAGACTTCGGGTATAACCCGATCGAAG
AGAACCCCTTTTATAAGGTGTTTGC GCGCAACAGTTACGATCCCGCGCTGGTGGGATCGA
TGTTGATCGCGTGGGCGTCGCGTCAGTCGAGACGCAACACCGTGTGGATCCGCGGTCCGC
CTAACACGGGCGCCCCGTTCTTGCCGAAGCGATCGCTTATTGCTGTCCCCTGCTGACAT
GCGTCGACTGGCGCAACAAGATGAACCCCTTCGAGAGAGGTTTCGAGTCCCTTCTGTTCT
GGTGGGACGGAGGCCACGTGCCGCACAAGAGCGTGGGCTTGTGCCGGCAGGTGTT CAGA
GGTGAGAACGTGATGTTCCCGCGAGAAGATGGTCAGATGAGCGAGCTGGTGCGCACCCC
GGTGCTGATGTACTCGGAGCACGACGTGTGCCGAACGATGATCAAGTACGGGGTTTTCA
GCGACGAGTACTCGGAAAGCCTCCGGAACAGCATGTACTGCCTGGATTTATCGGTTCCCA
CCGAGGGGAGCGAGTGCGTGACCTGCGGTGACGCCAAGGAATTTTTCGCGTGGGCGTAT
CCCCGCCGGATGGACTTTGACTTTTTCAAGTGAATTGCTTCCGCGTAGGCCGTTGGCGCGC
TATTTTCGTCCGTTTGCCCGAGTGACCCGGTCACGAGTTCGAGCCGTAATCTCGCGAGAC
GCGGCATTTCTCGCGCAATTTCCCGAATAAAGACCTCGAGAGCGTATTCTGAGCATAAA
GTGGTGTTTTTTATTGAGGGGATGTTTAAGCGGACACTTTACAGAAGGGGTAAACAAGTGA
TAATAAGGCGGAAGGGGAGGGCTTGGAGCGATTCTCGGAGCATTTTACAGGCGTCGAGC
AGTTTTTCGTTGCCGTAGGCCGTTTCGATGAGGACCTCGAATCCGCCGGGGATGCGCGTC
AGGGCGTAATTGCGCCGAACGGCGCGATGAGAGAGCAGATTGTAGAGATGGGAGAGCG
GATTGATCTCGTAGCGGAGATGCCCGTCTTGCCCCGAGGGCCCGATGGTGACAAAATTGA
AGTTTGTGATGCCGATGTAGGGGGACGGGTTTTTGCCCTGTTCCCGATGGAAGTACTCTT
GGACCTGATCGAGCCAGTAGGTGCAGATGACTTTGCTGGCGCTCTGACACATGAGACTG
AAAGGGTTGAGACAGGTGCAGTCGTAGCGGACGTGGGGCAGCCGGTAGTCGCTGTTGAG
GTCGGTGGTGACGCTCCAGAAGGAGTTGAAGAACCGGCAACGGGCCCCGACAGCTGGGCA
TGCAGTAGTGGGGCAGTATTTCTTCAAAGGAGACCGTTTCCTTTCTCCTGTAGGGGAACA
TGCGGTCTCCTTTGACGAATTCGAGGAAGAGAAGATCCAGCGCGAGATGCGCCGGCGCC
ACGAGTTTTGCGTTAATGCACTCGAGCGTGATGGAGTGACGCTGTCCTGAGAGGGGAA
ACGAGATAAAAATTAGAGGAACTCTACGGAGACGGGATAGGGGAAGGTTTTGAGGACGT
GGAGGAAGCAGGGCATGTGCCGAAAATGTTTGTGCGTCCTGGGCAGCGTGAGCCGGATA
GCGCCGGCGACGACGCGCACCATGACAAAAGTCCCCCGCGTAGAGTCGCGGTAGATGTT
GACGACGTTGTCCAGGACTTCGACGGGGGATCGGTGATGGCAGAGCGGGCAATGCCTGC
ATAGGCGGGAGACGAATCGGTGCAAATGGACCGGGAAGGGGTCGGAGTCTACGGGTCTA
TCGCAGATTCTGCGATGCCAGCGGGGGATGATGAAGGCGGCGAGGGCCTGACAGAAGAG
CGACATGGGCTCTTCGCACTCGCAGACGTAGGAGACGGTCCACGCGGCTCGGTAGGCGT
TTTTGGGGTACGCCTTGCGGAGCGCCTGGACCGCGAATTGGGATCGGAAGGGCCTGAGT
CGGAAGGGGAAGGAGGAGGGGACGTAGAAGGGCTCGGAGGGGAAGGGACATAGCGCCC
TGCCGCGCTAGGAAGGCGAGGAAGCGCCTGTCAAAGAACAGGAGGGCGGATACGTAAT
GGTAAGGGGAGCTGAAGTTGACGGTGTACGTGTGCTGACACGTATCGCCGAGGAAGTCA

CGATGGAACCGGTAGTCGAGGTCGACGGAAGGAGGACTCCGATTCTGCAGGAGAGAGA
GAAAACGTGCTTTATTGGAATGCTAGAATTCGGGGGATCGTACAGCGTGA CTGCCGAG
ATCTGGCAGAGGGGACTGTGCGGTTTACAATGCATGGTCGCGCCGCAAGACACCGTGTG
AGTCACGGTGGAGATAAAGTCTTTGAGTTCGCGCCTGGGGTTGAGGCAGGTCGGGGTCT
GGTCGTGCGGGGCGGTGAGGAAGAGGATGGAGGCGTTACGACACATGAAGGAGTAGGC
GATGGAGACGTTGGAGCAGTGGATGAGCATCTGCGGCGCCCGCACGAAAACGGGTTTTT
CGTGGATGTAACATGTACCCGAGTTTCCTTCCATAAAGTGGAGGGTGAGAGTGGACGGTT
GCGTTTCGACGAAGGGCACGCAGTAGAGGGAGGTGTGGGGCGCGATGGCGGCGAGGGCG
CGCGGTGTGCTTGAGGTCTCCGTGCGAGATGGCGAGCGGGAAGCAGGAGAGGAGGACGT
TG TAGAGGAGCTTGGCGTTGGAGAGCCTGCTTCCGCAGAGGACGAGGGTGTTGATGTGCG
CCGTCCAGCCACTTGCGGAGGGTGATGGCGAAGAGCGCGGCATCGTAGCCTTCTTTTTTCG
AGCACTTGATGGAACCACTTTTTCGTCGGGATTGTAGAAGGCGAGCCGCAGAGAGTCCGG
GTTGTGCGGTGGGCAGCTGGGCGTAGAGACTGCGATGGCTTCCGAAGCGATCTCGGAGAA
CGGCGATAACGCACTCTTTTTCTTCGGGGCGGAGATGGTAATCTTGGTGTTGACGTGCT
CGTCCCACTGCGACTGATGGGCGATGCCGTCTCGGAAGAGCTTCTCGACGAGGGCTTCCA
TCGCCGACGGAGCCTTGTGTGCTGTGGGAGAGGTTTCGCGGTGTCTTGGTGGTTTGAAAGG
AGGGCGTGGGCGGCGCTTCGGCGGACGCGTCGTCGTCATCGCTGGTGACGTCGCGCGCG
AGCGGCGATTTCTCTTAGTCTGGAAGAGAGAGGATATGATCAAAGTGCTGACGGCAGG
TACTGCAGGGAGGGTCGATCCAAGCGGTAGAGCAGAGAACCCCGAAGTCGTTTTTACAG
TCGAAATCCCTGTCCCCCTCGTGTTCCCTGAGTTGACGCAGATAGTGTACTAACTCGCTG
GCTAGGAAGGAGGCGCCGTCGTCGTTGGGCGAGTCGAACTGGATGATGAGATGGAATTT
GGGGTTGGTGGGCAGCTGATCGGGGCGCGGCAGCTTGTTGAGGCGGACGACGCACTTGA
TCTCCTCGATCTCGACGAGTTCTCCTTGGTAGGGGACGTTGAAGGAGCGCCCCCTGAGCA
TTTTCGTTAACGAGCGGGTTTTTGAAAGGAAAGTCGTGATGGAGAGGCGGGAAGTAGAGG
AGCTTGGTGACCTCCCTGACGGGCACGAAGCGCTCGAAATCAAAGTCGTTGATGTGAGA
GGTGAGGACGCAGTGGAACATGCGCAAGATGGAGTTGGTAAAGGTGTCGGCGCAGGTGG
CGGAGTCGCCGACGACATAGAGGGTGTTGATGGTGTCGTGCAAAGCGGGAGATGGTGTA
ATCGCTGAGCCACCTCCCTAGCATGTAGGTGAGGGTAAAGAGGTTAAAGCCTTCTCTTTC
GGCAAAGCTAGCTAGCATTGCGGAGGAGTTTTCCGTAGGGCAGGGAGAAGGGGCGTTAT
TGATGAGGGTTTGGTAGAGACTAAAGTTGCAGTAGGTTTTCTGGCTTCGAGCAAGATCA
TTTTTCCCTGGGGCCCTATGCCGTGCCGAGCGAACTGCTCGGGATCCCTCAGCCTCCATTC
GGACTCGGTAAAGATGTGCCTCTTTTGGAGGCTATAGGCGAGCTCAGTGGGGTTTTCGGT
GGCGAGACGCTTACTGCTGCTGCTGGCGCTGTTGCTGCTCTGCCTGGACCTGCGGCTCTG
GAGGAGGGGGAGAGATGGGTTCAAAGACGGGTAGTTTGGGGCGCTTGACTAGCTGCGC
CTTGTGCGCTTCCGCGAATTTGATAATGAGCTTGGAAGCCCGGAAGAATTTTTCTGGAT
GTTAATGTTGAGGGGGAGAATGGCATAGCGCTGGTCGAGCACGCACCAGCGGAAGGAGT
CGGAGACGGGGTCTGGGGAGTAGGTGAGCCAGCTGAACTTTTGGTTCTGCTGGAGGTAG
GCAAAGTAGGCTTTGAGGAGCACGACGAGCTCCTTGCTGATGTTGTGAGCGTAGGAGTA
GAGGAAGCGGGAGA ACTGGA ACTGGGGGATGTGGCAGGAGAGGATGTGTATTTTGGCGT

TGACCTTAAGCGTGGGCACGTTGCCGATGGCGGTGCGCGGCGCGAGGTTGTGGAGCACG
ACAAAGACGTAGAAAGCGGTACAGTTGGCGGAGCGCGCAAAGAGCTTAGAGGGGAGAG
CGTGAAAGAGAACCGAGACGCTAGAGCCGGAGCAGAGCTTATCCATGCACTCATCCATG
ACGATGGCGATGGGTCCCTGTGCGGAGGCGTTAACGTAGACGTTGTGCGGATGCTCGATG
TTGAGGTTTTCGGGCGAGGTTGCTTCTTCGTACGTCATTTTCGACGAAGTCCGGTCGAAAG
GTGCACGTTTTGGGCGCGAACGTTCCGTCTTGGCGGCAGCTGTAGTTGGACTCGAGGAGC
TG TAGGTTCCAGGCCGTCTGTTCCACCGGCGGGATCATATTCTTCTCCGGGGTAACGAAG
ATGACCGTCTCCGGGATGGGTTGGAGCATATCGCAGGAGATGAGGGCTCTCAGGAGATG
ACTCTTCCCCGACCCCGTCGGCCCGTAGATGACTCCGATGACGGGCTGCCTGCCCATGTT
GAGAGAGGGCAGCTGTCCGTCGACGAGGAAGCGGCTGTCTTCGCGCTCCTGCCGCTCGA
CGGCGCGTTGCACCTCGAGAAACCTCTCGTCCACGCCCCCGAGACTGTAGAAGTCGTCGA
AGCTGGGAAATTTCTGTTTCGCGAAAGAGATGTGGGGCTAGATCCGCCGCCCGCTCGTACC
ACCCCGTGACCCGCTTGTAGAACTCTCCCGACTCGAGATACTCTTCTCTCGATAACGCC
ATATTTTTCTCTTTTTAGGCTCGACGGCGTTCATGGGTGCGCGAGGAGCTCCAGGATCTCG
TCACAGTCCTCGACGGAGAGAGAGCGGTGCGGGGCCGAAGTCGAGGAAGTCTTGGTCGTC
GTGGTCGTCGCCCCGGGCCAGCTGCACGGCGCTGCGCGGCAGACGGAGCGGGGCTAGCG
GATCTTCGTGGCCACCGGGGGCACTCTCCGGACTTCGTGCGCGGTGCGCGGGTTGGGGT
GCTCGGTGTCTAGGGGTAGAGGTAGTCCCCGTGTCCGTACTGCGTGAGATCCTTCCAGG
GTCTGAGGACGCGCGTGAGCTGCTCGTTGTGGATGGTGAACGGGTGCTATCGGCTGACCT
TGTTGAGCAGCGTGGTCTTGAAGATGGTCCGTGCGGTGTGCAGCTCGGGAATGGCGCTGA
CGGCTCCGTACGACTCGTCCTCATACCTCTGCCAGCAGCGCTCGAGCGTGTCTATATAA
GCTCCGCTGCCGGTGTCCCTTGGACCGGATTTTCCCGGTGCCACGTGACCGCATCGGG
GGTCGAGACAGACGGCGTCCCTTGAGCCCGTAGAGCTTGGGGGCGAGAAAGATGGCCTCC
GAGCTGTAGGTGTGCGCCCGCAGCGCTTGCACCTTGATGTGCGAGTCGAGGCCAGTAG
AGCGCGGGGTGCTCGGGGTGCAAGGTGAGACGGGTGTGCGGGGTCTTGATGCGATGGGC
GCCCTTTCTTCATGCGGCGGTAGCCGGA CTGCGTGACGAAGAGACTGTGCGTGTGCGC
GTAGAGGGTCTGGGGGTCCCTTTGGAGTAGGTGTGTCCCCCTGTCCGGTCCGTGCAGAAT
CTCGCACCACTCGCTGAAAAAGGCCCGCGACCAGCCCAACACGAAACAGGCGATTTGCG
TGGCGTACCGTTTATTTTCGACCATTTTGTCTAAATTTTCCAGATGTAACACGGTCAACGC
TTCGGGGGGCGCGTCGAGCAACCGCATGGGCTTGAAGACGGTCTCGTTGGCGGGCGCGT
AGTGGGCGTGGCCATCGCCGAGGGGCTCCTCTATAAAAGGGGGCGCGCGCAGGGCTTCC
TGCAGTTGGTGATCGACTTCCGCCAGGGACGCCTCGCGTGCGGTAAGTGCGTTTTTCGACC
T TACTGGTACTCTCGCCCTCCTCCTCCTCCCCCTCGCTCTCCTCCTCCTCCTCGTCCTCC
CCCCGTTCCCCCTGCTCTGGTGGGTCTAGCGGAAGTAGCGGTGAGTTCCGGTTTCCGG
AAGGTGCCGGCCCCGGGGCGTGGCGGGGCAAACGAGGGTGCCCGTGAGGGAGTCGTG
ATTGAGGAGTGTACGTGACGGACGATCTGGGTGCCCTCGTAGATGCCTTGTTTGTGCTC
CTCGGTGAGGTCCTGTTTGAAGAGGATGCGCGTGGTGTCCATGTTGGTGGCGAACGCGCC
GTAGAGGGCGTTGCTGAGCATTTTGGAGATGGAACGCATGACTTCGTTTTTTCTCGGTC
GGCTTTTTCTTGGCCGCGATGTTTTTGCTGACGTATTCCGCGCAGACGGGTTTCCACGTG

GGGAAAACGATGTTTCATGTCGTCGTGGAGGGCCGTGACGGCCCCACCCTCGGTTGTGCAA
CGTGAGGATGTCGAGGACGGTGATGACCTCGTCGTACAGCGCTTCGTTGGTCCACACGAG
GCGCCCTCCTCGCCGGGAGCAAATGGGCGGCAGCGTGTCCAGCTGTTCTGCGGGCGGTG
GATAAGCCTCGACTTTTAGGATGCACGGTTTGATACGGGGGTGCAAGTAGCTGAGCGGG
CGCTCGCGGCTCATGAGGTCGTTGAGTTCGTCGACGTGCTTGGCCGTGAACTTGGGATCG
AGGGGCATGCCGTGAGGCATGGGGTGCGTGAGGGCGGAGGCGTACATGCCGCAAATGTC
GAAGACGTACACGGGACGGCGGTAAGGCCCCGAGGATGCTGGGGTAGCAGCGACCGCCG
CGCAGGGCCTGCCGTATGTACTTGAACATGGGTGCGTGCGGGGCGTAGATTTGCGCGAC
GTAGTCGGGCGAGAGGGTCCTCTTTTCTCTTGGGGCGCTTCTTTTTCTTGGCGGCGTCC
GGGTCGGCGTCGGCGTCGTCCACGGGAGGAAGGAGAGCCGCCTTTTTTCTCCGTTTGGGC
GGTTTGGGGGGCGGGGGCGGTTTCGAGAGAGGCGAGGAGTCCGGCTCGTTCGTGCTCCTG
GACGTACGACGTGAAGGTAAGTTGTTTCCAGAAGGCGTGAGTATTGCTGGGGATGGTGG
GCCTGAGGAAAATATTGAAGTGTCGTCATGCCGAGTTCTTCGCGAAAGTACTTGTCGT
AGCTGTGGTGGAGGGTGAGCGCGAGTTTTTGGGTGACGCGCACGTCTGCATGCAGTACT
CGAGGCAGGCCTGCACGATGTCGTAGGGCTGGCCGGGATGCTCGTCGCGCCAGAGCTGC
TTCTGCTCGTCGATGACGGCGGGATCCTCCCAGTAGCGGGCGACCGGGAAGCCGTCTTCG
TCCCGTTTCAAGGAGCCGAAGGAGACGTGTTTCGTTGACGGCTTCGTAGGGGCACTGACC
CTTGGCGAGCTCGAGGGCGTAGGCGCCGGCGGCCCTTGGCGAGTTTGGCTCCGCTGGTGA
GCTGGAGCGTGTGCGGCACCATAAAGCGGACGAGGACGGATCGGGAGTCGGTGTGGGAG
ACGACGCCCTTGGCCCAGCGATGGAGCCTCGTGGGGTCTTTTTTCTCAAAGTTGGGATTG
GGTAAGTGGAACAGGACGTCGTTAAAGAGGAGCCGTCCCACGCGGGGCATGAAGAAGC
GGTCGCAGCGACACGCTTGCGGGAAGAGGTGCGGCGTTCGACGAGTTCGGTGGCGAGG
AGGAGTTCGTCGAACTTGCAGATGTTGTGACCGATGACGACGATGTGCACGTTGTAGAA
GTCGTGCGGCAGCTGGAGCTGTTGGGTAGGTGCTCGAAGAGCTCGTAGGGGATGTCGT
AGCGCGATCGGTACTTGCCTTCGCGCATGACGGTCCTGACGTA CTGTCGTTTGCCCGAC
AGTAGCGATCGACGAGGTCTTCGGCAAAGTGCTGCTGCAGTCGGGATCGGTAGGCGCGG
AACCGCCTCGCGACGAAGCCGGGCCTGACGTCTAGCCAGTAGAAGCCCTCCTGGAGGCG
TTTGAGTTCGGGGTTCGGCGACGGCGAGGTGCGTGGCCGCGCGCACGAGCGCGGGGTCCC
CGGTGAGCATGAAGCAAAGCATAAAGGGATGCATGCGCTTGCCCTTTTTTCTCGAAGACG
GTGTACGTCTCGATATCGTAGGTGAGAAAGAGCTGTTTGGAGTGGGGGTTTTGCGCGGGA
CAGGAGAAGCGAACGTGCTGCCAGAGATCGCCGCCGTACTTTTGCACGGCGTGATAAAA
GAAAGAGGAGCGGCGCTCGTTACAGGTGTGGTTGCGCACCCAGTGTCGGCCGCAGGCGG
GACAGGTTTGGACGGCGGTGCGGCTGATGATCCAGACCCACTGCCGCGCTGGTCCTTGG
CGACGAGCATGGGGGGAAGGACGGGATCGGCGCGCTCGGCGACGCGCCGGACCTTGGC
GACGCGCCCTCGGAAGCGCACGATGCCGACGTAGGCGGGTTTGAAGACGGGCAGGCGCT
CGGGCGGGTTTTCTGGTAGTAGCCGTAGTCGATGCGGTCGTAGCCGCGGGCGCGCTTGG
TGCTGCCGACGAGGAAGTTGTGGAGCCTGAGGAACTTTTTTCATGCCCTTGTGGAAGGGTC
CCGGCTGCAGCCTGTAGGGGACGCCGTCGATGTAGTAGACGTTGGCGCGGATGGGATCC
CCGTTGAAAGGATTTGAAGTGGGTTTTGGCTCGGATCTGGGTGAGGGTTTTGACGAGCGC

CGATTGCTCGGGGCCTAGAAAGGGTGTTCGAGGGGCAGGCCCCGCTCGACGAGGGGAG
GCGGTGGCGGCGGGGCGACGACGATGACGACGCCGAGGAGCTCATCGTCGCAGGCGATGC
GGGGGCGCCGCGAGGGCGGGGCTGCCGCAGCAGCAGCAGCAGCGTGACGGGCGACGG
CGATTCCTGTTCCCTGTCCCTGAGCACGCGACGCAGGTTGGCGGTGATGTCGTCGTTGG
TGTTGATGGCGACGATGCCCCGGAACCTTGATGCGGAAGCTGATGTCGATGGAGTCGATG
AACTCTTCGCTGAGGTTGAGTTGCTTGAGGACCTCTTCGATGTCACCGGAACGGTCTCTG
TATTGGATATCGGAGAGAAAGAGTTGTTGGTCTGCCTCGTCCATGCCTTCGAACTGCCCCG
GTGCGCTCTACCATCATGAGAAAGTCGCGCAGGATGCGGCTCCAGAGTGTTCGAAAAT
GGTGCGGGGTTAGATTGCTCGCTCCAGATGCGTTTAAAGACGGGCTCGGCGTTGACGTC
CCATCCGACCAGGAGGACCTGGAGGGTGGTGACGTCGACATAGCGACGGAATTCGCGAT
TAGAAATGAAATGCGTGTAAGAGATAGTAGAGCGTGAGGCGACGTGCTCGGCGAGAAA
GAAGTAGAGAAACCCACTTTCGTAGGAAAGACTCGGTGACGAGCGCGATGTCGGCGTCCC
GCGTTTGCAGGAGCAGTCGGTAAAAGTCGTTGGTAAATCGAAAGAGTTCGTGCCTGCGC
GCGGCTCCGGTGAGTTCTTCTTGACGGGCGTCGATGGCTTCGAGAACGGTGCGGATGACT
TCGTGAGGAGCGTTTCTTCTCCTCCTCCTCCGCCGCGGGAGGCGGGGACGGGCTCC
TCCTCCACCTCTTCTCCCACCATGGGTCTTCTCCTCTTCGACGGCGGGCTCCGGTCGGGGCA
CGCGCCGGCGTCGGATGACGCGGGGCAGCCTATCGATGAATTCGCGCACGGCGCGCCGT
CGCACGCGCCTCACCTGGGAGGCGGTGATGGCTCGTCCGGTTCGGTCTCTGGGCCGGAGT
CCCCTTCTGTGGTGACGCGGCGGTGCGGAGCACGATGGCGCCGCCGGAGAAGCCGCC
GCGCCCCCTGCTCTCGGCGTCGTAGTCCTGTCCCGTGGCCAGAGTGCTAACGAAACATCT
CGCCATCGTTTCCGCAGGTTCCCTCAGCGTGTGATCTCTGGGATCTAACGCCGCTTGTCGCA
GCAAGCTCTGCGTGTCGAGCTCGCGGCGCGCCGTGCGACGCGCCTCACTGGGAGGCGGT
GATGGCTCGTCCGGTTCGGTCTCTGGGCCGGAGCCCCCTTCTGTCGGTGACGCGGCGTTGC
GGAGCACGATGGCGCCGCCGGAGAAGCCGCCGCGCCCCGCTCTCGGCGTCGTAGTCCTG
TCCCGTGGCCAGAGTGCTAACGAAACATCTCGCCATCGTTTCCGCAGGTTCTCAGCGTG
GTGATCTCTGGGATCTAACGCCGCTTGTCGCAGCAAGCTCTGCGTGTCGAGCTCGGCGGC
GCGCCGTGCGACGCGCCTCACCTGGGAGGCGGTGATGGCTCGTCCGGTTCGGTCTCTGGG
CCGAGTCCCCTTCTGTGGTGACGCGGCGGTGCGGAGCACGATGGCGCCGCCGGAGA
AGCCGCCGCGCCCTCTGCTCTCGGCGTCGTAGTCCTGTCCCGTGGCCAGAGTGCTAACGA
AACATCTCGCCATCGTTTCCGCAGGTTCCCTCAGCGTGGTGATCTCTGGGATCTAACGCCG
CTTGTCGCAGTAAGCTCTGCGTGTCGAGCTCGGCGAACGCGTCTGTGAAGAGCGTGAGCC
AGTTTTCTTCGCCGAACACATCGGATCCAGGTAAGAATCGATACGTGTTTTCCGTGTAA
AGCGTTCGCGCGCTAACAGAATAAGTAGTGGCACAGAGCGACGCGGAGGCGCCGAATG
GCTTCTAGCAGGACGGCGTCGTCCCTGGACGCCGCTCGTAGGAGGATGTCGTTTTGCAA
CCCGCTGCGCCGCTGCCGAGAGATGGCTGCGTGCCGCCGCCGCCGCCAGGTCGTGCGC
CGCCGCGGCGTCGTGCGCGTCGTCTTCCCCACCGCCGCCGCCGCCAGGTCGTGCGC
TCCTCCACCCACGACGTCGCCGGAGCGCGGACGTCCACGCCGCTCCCTGAGATGAAC
GTGCGCCATGTCGGAGGCGATGCGATCCATGAGTACCGCGTTGTGCATTTGTTGAAAGCT
GTCGTGAAAGTTGTCGAGGTCGAGAAACCGCATGTAGGCCCCGACGTTGACGGAGTAGG

AGCAATCGGTGAGGCAGGTCCAAAAGAGTCTTCGCGGGCGCTGCGCGGGCGGACTCTCG
TAGCCGAGCTGCATAAACTCGATTTTCGAAAAAGTAGTCGTTGAGCGCGCGATGCATG
TACTGGTAGCCGAGCAAGAGATGAGGCGGCGGCAGCCGATGGTACGGATACGCCGCGAC
GTTGGGTCCCCCGGGCTGAGATCGCGGAGTTGCATGAGACGGTAATCGTAGAGCCGAC
TGACGAGGGCGACGCTGTTGGGGTTCACGAGCGCCGGCTGATGCCTGACCATGGGAAAG
TCTGAGGCGATGACGGGTTGGCAGAACCGAACCGTGTTTAGACTTTGTCCGGTGAGCTCC
GCGAAGACTCTGTAAGCCTGAAATTGAGCCCCTGACGTTTTTAGAGGAGGGTCCGTCACC
CACCGTCACCGCCGCCGCCGCCAACATCATCATCTCATCACACCACCGACCATGCAC
CCGGTACTGCAAAACGTTTCGGAACGCGAGCGGGGTCGAAGGACAGCAGCGTCGTCTACA
GCAGCAGCAGCAGCAGCATCTTCCGCGCGGCGGGGATCCTCACCAGCAGCGCTATCGAC
ATCATCAAGCCGCAGCAGCAGCACCAGCAGCAGCGCCGCCGCCGCCGAGCAGCAGCAGC
AGCCACCGAGCCGGAGTCGCGTGCGCCCTCCCACGCCGCCGAGTATCCGGCTCAGCAC
GCGCTCCCCGGGCGCGGCGGAGGCGGACGCGTATTCGGAGGACGGAGGAGAGGAGGGCG
GTCCCCCGTGTGCGGGCTAGCGGCCGAGCGGATATAGATGAGATCAGGATGAGAGAG
CGAGAGAGCGGGCGCCGCCGCGGTGCCGAGACGAATTTGTTTAAGGCGAGCAGGGA
CGCGTTACCGCAGAACGACTACGACAGGGAGGCCATGTACCGCGCCGGACAGGCGCTGA
GCGTGAACCGCCGTCGCGTGCTGACGGCGGACGACTTCGCCTACGGAGAGGGTCAGGAC
CCGTCGTTACGCCGGGCGCGAACCCTTGCGCGCGGCGGAGTTGAAGCGCGCGTCCGA
GCAGACGGCGTTTCGGCGAGGAGATGCGCAACAGTTGCCACCAGACGCGCTTGCGTACGG
CGCTGATGCGGCCGGAGTTGCCGGCGGGCATCTACTACCTGTACGATTTTCGTCCAAACGT
ACATGGATCACCCGGACGGTCGCGTGAAGCTGAACCCGCAGTTGGTGCTGGTGCGCAG
CACGCGGGGAACACCATGCTGGCTCAGCGCCTGTGGTCGATCGCGGAGGAGAAAAACGC
GTGGCTGCGCGATCTGATCGAGATGGCGTACATGATCGTAAACGATCCTTACTTGAGCAC
GGAGCAGCAGCTGGCCGCCGTGTGCACGACGGTGGTGGAGCTGAGCATGAAGTACGCCA
AGATCGCGGCCAAGAACGGTTACCCGTCGATGGCTCAGATGGCCAAGGCTCAGGAATTT
TTTTACCGCGTGATGGAAGCCGTGTTAGACTTGGGCGTGCAGGTGGGGGTGTACAACAAC
CGTCCGGTGCGCTTCCGCCAGAAGCGCATCAGCGAGATCCCTCAGATGTCTGACGCGGAC
TACATGTTTCGGTTTGACCCAGGCGCTCGAGAACAGACCTCCTCAGGGCGAACTTTTCGCG
TCGGACGAGGGCGAATCCAGCGACGGCGAGGAGCAGGACGCGGGATACGATGACGACT
ACTGAGTCGTTTTTTGGCCCTGGCCCTACGGGGCGCGAGGAGGTGGCGGAGGCCTTGAG
CTCGCTGCCCCGACGAGGCGATGCGCGTTCCCTGCGGCACGCTCCGTACGCGAACCGGCT
GCTTAAGCTGCAGACGGCGATGGTCCCTCCGAAGATAGACGGTACCTCCGAGCGAGTGG
CGGAGGTGGTCAAGGGGCTGGCGGAGCAGGGCGCCATTTACCCCGACCAGATGGGGGCG
ATCCATTTCGGATCTCCTGAACCGCGCGCACACTTGGAACCTCGATGGGCGTGCAAGAGAG
CATCCAGGCCCTGGTGAACGACGTCATTACGGACAGAACAAAGCGCTGCAGGACGAGC
TGTCTCGCACGCGCGAAATCGCGAACGCGTCGCTCCTGACTCAGTTCTTCGATAGCATTT
ACAAGACGGTAGATAGGGGCCAGCGTAACTTCGAGGGCTTCAAGAAGCTGCTGCGCCTG
TTCGTCAACAACGTGCCAACGCCGAGGTGTACGGCGCGGGCGGCTCGTTACGATGCA
GATTAACCTGGGCGGCACGAGCCAGAACATCAACCTGACGAACGCCTTCGATAACTTGA

AGGACATCTGGGGCGCCCGGTGGGACGCGGTGAACAACCCGCGCATCGGGGCCCTGCTG
ACGCCCCAACACGCGGGCGCTGCTGTTTTTCGTGAGCGCCTTCTACGACTACGGGGCGATG
GAGCCGGGCAGCTACCTGGACAACATCCTGCGGCTGTACAAAGAGGCCATCCGCGCGGA
CATNGACGCGGAGGGCGACGCCGTGATGGAGCTGGGCGAGGCGGGCGCTAACCTAAACC
TGCAGTTCAACGAGTACAAAGACACGTTGAACTACCTGCTGCAGAACCGCCAGACGGTG
CCGGACACGGCGCCTCTGGAGCTGAGCGAGGAGCAAGAGCTGCTTTTTAACTATCTGATG
AGGCAGTTGAGACAGGCGCTGAAGGATAGGATTCCGTCCGACGTGTCGGTGAGCACGAT
GGCGCAGTACGTGGACCCTCGTCTGTACCAGACGAACAAGGTGTTTCATCGAGAAGCTGC
AGA ACTACCTGCTCGCGGCGCACGCCCGTAACCCGCACTACTTCCGCTCGATCGTGATGG
ACCGCAACTGGCGGCCGCCGCGGGGCTGTTTACGGGCAATTACGTGATCCCGGAGCGC
TTGCCGCTGGACTACTACGACGGCGACAGCGTGGTGGGAGGCCCGTCCCGCGACGAGTA
CTTCGAGGACTATCCGTACGCGAGCCGTCCGCATCACGGCATGACGGCGCGCGAGCGAG
CGGATCTTCAGGATCAGCTCCAAGACCTGACTAGCCGTCTGGACCAGAACCTGGGCGTGC
AATCGGAGGCGGGCTGGCTGGCGGACCACCGTCTGCCNAACTTTTTTCGACGGCGCGCTCA
ATCTAGCGGACCCGGCTTCGATTCCGCTGCCCTGTGCGCTTCGGACCAGTCGATGCAGT
CGAGCCGCCGACGCTCTCTGAGCAGCATGGACGGCATGTTTTTCGAGACTGAACCTCTCGG
GGCGCGGGGGCGCCGGGTTTTTCGCGAGCTTGGGTCCCTCGCTGGGGAGCCCCCGTCCGT
CGAGCAGCGTGCGGCCCGGGGGCCTCGCGTTGGGGCTGAAGGGGACGGGCCCCGATGCGG
AGCTGCCGCGTCGGAGGGATGTCTGGCTCGGGCCTGGCCCGGAAGGCGCTGGCGGCGCG
TTCGACGCGGGACGGCAAGAGGCTGCGCTTCTACTAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCG
AGCGAGCGAGCGAGGGGACGATAGGCAAGACAGGGAGAGCGCGGAAAAAAAANA
GAGAGAGAGACGGAGACGACGCACGCGTGTAAACGAAAGGGAACCTTACCGCCATTTCTAG
CGTTCACGAGCGGCTGCTGCGGCGCGATGCTGGGTCACCACCACGAGTTCGGGTTTTCGCG
AAGCTGGGCTCCAGCGGCCCTCCTCCTCCTCAGCGGCGGCGGCGGCGACGTCGGTTCTC
CCGCGCCTCCTTCTTCTCCGGTGTCGGGAGTCCCCCGACGATGACGATGGTGGGACGAC
AGCTGCAGCAGCAACGCTATCCGGCGACGGTCCACGGATAACCCTCCGGTGATCCCGGCTC
CGGACTCGGCCGTGGACAACGGGACCGAGCTGTTTCGTGCCGGTGACGCGGGTGATGGCG
CCTACGGGAGGACGGAACAGCATTAAATACCGGATTACGCTCCCTGCCAAAACACCAC
CAAATTGTTCTACGTAGACAATAAGCTGAGCGACATCGACACGTTTAATCCGGAGGCGA
ACCATAGCAATTACCGAACGACCGTGATCCACAATCAGGATCTCGATCCGGCCACGGCG
GCCACCGAAACGATTCAACTGGACAACCGATCCTGCTGGGGCGGCGATCTAAAAACGGC
GGTGAAAACCAATTGCCCGAACGTCAGCTCGTTTTTCCAAAGCAACACGGTGCGCGTGA
AACTGATGAGTTCGCGCGACCCGATTCCCCCGGGCACGCCGGAGCCACGACGCCCGCG
GCGGCGTACGCGCCCGCGGGCGCGCAGTACAAATGGTACGACCTGACGATCCCCGAGGG
CAACTACGCGCTGCCCGAAATTATCGACTTGCTCAACGAGGGGATCGTGACGCTGTACCT
GAGCGAAGGGCGGCAAAACAACGTGCTGCGTTCCGACATCGGCGTCAAATTCGACACGC
GCTACCTGAACTTGCTGCGCGACCCGGTGACGGGGCTGGTGACGCCCGGCACGTACGTGT
TTAAGGGCTACCAACCGGATATCATTCTGCTGCCGGGCTGCGCCGTCGACTTTACGTACA
GCCGGCTCAGCCTGGTGCTGGGCATCGCGAAGCGCGAGCCCTACTCGAAGGGGTTCGTG

ATTACTTACGAGGACCTCGAAGGAGGAAACGTGCCGGCGCTGCTGGACGTGGACGCTGC
GCAGATGAGCGGTGCCGATCAGGACGTGATCGAGCTGGCGGACGCGAAGCCCTTGTTAA
AGGACTCGAAGGGCGTGTCTATAACGTCATTTACGACTCTAACAACCGTCCCGTGACCG
CTTATCGCTCCTGGCTTATCGCGTACAACCAATCGGGCTCTGCCGCGAATAGCACACCT
TGTTGACCGTGCCGGACGTGGGCGGGGGCATCGGCGCCATGTACACGTGATGCCAGAC
ACGTTTCGTGGCGCCGACCGGGTTCAAAGAGGACAACACGACGAACCTTTGCCCCGGTCGT
GGGGATGAACCTGTTCCCCGCCCTCAATAAAGTTTATTACCAGGGCGCGTCCGCCTACGT
TCAGCAACTGGAATAATCCTGTCAGTCGGCCACGGCCGCCTTCAACCGGTTTCCCGAGAA
CGAGATCCTTAAGCAAGCTCCGCCTATTAACGTGTCCGCCGTGTGTGATAACCAACCCGC
CGTCGTTACAGCAGGGGGTGTGCCGTTGAAGAATTCCCTGGCCGGTTTGCAACGTGTGCT
CATTACGGACGACCAGCGTAGACCTATACCTTACGTGTATAAGTCTCTGGCTACGGTTCA
GCCGCGCGTGTTGAGCAGCGCCACTTTGCAGTAAAGCAGCCGCCGCGTCTTCGTGCGCGA
CCGTTGAAACCATGTCCATTCTGATCTCTCCCAACGATAACAGAGGTTGGGGCATGCGTC
GTCGCAGCAGTCGATCGTCTATGCGCGGGGTGGGCATCCGCCGCCGACGGCTAACCCTGC
GCACCCTCCTGGGATTGGGCACGGTTAGCCGACGCAGGAGAGGGCGGTCTTCAGCCGC
CGCTCGTCCAGACCCGCCTCGACCACCACCCGTTTGATGGTGGTACGCACCAGCCGAAGA
AGGAGACGTTAACGGCCGCCGTCGACGGACGATCGGGAAGGAAGGAAGGGAGGAGGAG
GGAGGAGGAGCGCCTAAAAAATGTTATTGACGGGACTTGTGTGTAAAAAACCTCCAA
AAAGAGAGACAGTGATGTTTCAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAACAAAATCACG
TTGAGGAGATCGACTACTGATGATTCGTGCTATGTGCTACGCAGGAAGCGTTCGTGAC
CACCTCAAGCGCTCGTTCGTTCAACATCGCCATTATGCCTGCGGTAGTGCTTACGGGGGG
CCGAATCTCTGTGCGCAAAAGGAGATCCGCCGCCGCCGCCACCATTCTAGACGAAGAA
TGCCGGCTTCCAAGCTCCGTTCCACCCGCGGCCGCGCTCGACGCGGCGGGCTCAACGGTA
GTAGTAGTAAACGCAAAAGCCGATCGCTGGCCGTATCGGTGCCGGCGCCGGCTACCGCG
TCGTGCGCGGAGCGGGCCGCGCTAGCCAACTTAGCGACGCGGCTGCAACGCGGTCAGTT
TACGGCATGGCGATCGGCTAATTACCCCGCCCCCGCGCCTCGGAGGCCGCCCTGGCGGG
CGCCAAAAGCGGCGCGCCGGCTACGGCCAGGGATCTCACGACAGGGACGACCGCTACGG
CGGTTCCCGTTTCAGGTTCCGGAGCGACGCGAAGGAGTAGGACACGCCGCCGCCGCGGA
GGAAAGCAGCTCAAGGGCGGGATTTTGCCCCGCTCTCATTCCCATATCGCGGCCGCCATC
GGTGCGATTCCGGGAATCGCGGGAACGGCTGTGCGCATAGCCAGCTTGAAAGAGCAACA
GAGACAATTCGATAAGATGTACAATCACAAGTGAGAAGGAAAAAGGAGGNAAGGAAGG
AAGGAAGGAAAAAGAGGAGATGCGTGCGTGCGTGGTGGGGTGCTGTCTAAAGGCCGTT
TTCAATAAAAACTTTTTATAGAACTTTTCGCCGCCGTCGCCGCCGTTTGTGCTGCGCGTTG
TCGTGCTCGTTGTCAACCGAGTGAGAGTCGGGCAGCATCATGGATTACGCCGCGCTTTCT
CCGCACGTGCGTAGTTGGGCTCTGCGAGACGGACACCTCGGAGACTCGAGTTTGCGCGG
AGGCGCTATAAACTGGGCCAACGTGGGCTCGCGCCTCTCGAGCGCGCTCGGCACGGCGG
GCCGCTGGATCTCTAACCAGGGGAACCGATTCTCAACTCCCAAACCTTCGGTCAGATCA
AGCAGGGCATAAAAGACAGCGCGTGATTTCGTAACGTGCCAACCTAGCCGGGGAAAC
GCTAGGGGCGCTCACCGACATAGGTCGCTTGAACTGCAGCAAGACTTAGAGAAGCTTC

GCCGCAAAGCGCTCGGAGAGGACGGACCCGCTCGCAGGCCGAGCTGCAGGCGCTCATT
CAGGCCCTGCAAGCTCAGGTGGCCGCGGGAGAATCGGCTCCCGCGTCCGCGCCCACCGC
GGCCGCCCCACCGGACCCGAGCCCCCACCTCTGCGTCCCACGACCCGTCCCATTCCAGA
AATGGTGACGGAGGTGCGGCCTCCCGTGACGTCTCGGCTCCCGCGGTGCCAGAAACGG
ACCGACCGATGACCTTAGAAATGCGCCCCCGGCGGCGAAGAGGAGACGAAAGCGGCCC
GCTCCCGGCTCTTGGCGGTCCCGACTCAACAGCCTGTGCGGCAACGGGGTGGCGACCTCT
CGCCGCCGCATGTGCTACTAGAGAGAGAGAGAGTAAACGAAAGAAAATCAAAAAGACA
GAGTGGGAGAGATGATGTTGCTGCGAGCGTTAGTGTTCGGCTGTAAAAACAACAGTAT
GTCGCCGTTTTTTTAGGTGATCCGTGCGCGGTGCTTTCGGCATGGCCGCGTTTACGCC
GACCTGACCACCGCGACCCCGCGGTGCAGTATTTTCACATCGCCGTCGAGCACCCGG
GAGTACCTGTCCGAGGACCTTCAGCAGTTTATCGCGGCGACCGGAAGCTACTTTGAATTG
AAAAACAAGTTCAGGCAGACGGTGGTCGCGCCTACCCGCAATGTCACTACCGAGAAGGC
CCAGCGGCTTCAGATCAGGTTCTATCCACCCAGACGGACGACACCCCCAACAGTTACCG
GGTTCGGTACAGCTTAAACGTGGGGGACAGCTGGGTGTTGGACATGGGAGCGACCTACT
TCGACATCAAAGGGGTGCTCGACAGAGGTCCTTCAAGCCCTACGGCGGCACGGCTT
ACAACCCCTGGCCCTCGCGAAGCCTTCTTTAACAACCTGGATCGAGGACGATGGAAC
AACACAACCATCACGGGGCAAATGACCAATCCGTACAAGAACGAGGCGCAAAACACAG
CTACGGCAACAGCTGCAGCAATCGCCAGCGTTTCAGGCTCTTATCCTAACCTAACGTGG
GGCTGGGCATTAGCGAAATGGGAGCCCTCACCCCGACACTAGCAGCACAGGTGCGTCTG
GCCGTCGGTTTGCCAAGGTGTCGAGCGAGAACACGCGCCTGGCTTATGGAGCGTACGT
GAAGCCTCTAAAAGACGACGGCTCTCAGTCACTTGAACAACGCCTTACTACGTGTTAGA
CACCACGGCACAGAAATACTTGGGCGTCATGGGGGTAGAAGACTTTACGCAAAGTCTTA
CCTACCCAGACAGTCTGTTAATCCCCCTCCTTCTGAGTACGGAGCGGTTAACAGCGGGG
TGATGAAAGCCAACAGACCCAACTACATCGGGTTCCGTGACAATTTTCATCAACCTCCTGT
ACCACGATACCGGCGTGTGCTCCGGGACCCTCAACTCCGAACGGTCAGGCATGAACGTG
GTGGTGGAAATTGCAGGACCGAAACACCGAACTCAGCTACCAGTACATGCTCGCCGATAT
GATGTCCAGGCATCACTATTTGCTCTCTGGAACCAGGCCGTGGATCAGTACGACCACGA
CGTGCGCGTGTTTAAACAACGACGGCTACGAGGAGGGCGTGCCACGTACGCCTTCTCGCC
CGAGGGTACAGGTCAGGGCCCCATCAGCTCGTCAAATATTTGCTGTGCGGTGTCAAGGT
GTACGTTAACGGTACTGCTGGTACTAACGACAAAGGCGCCGAGCTGACGGATCCATATA
CCACCTACCTCAATGCCGGCGCCGTGCCTTCTACGAGATCGATCTGGCGGCCTCCCAGC
GGCGTAATTTTATCATCACCAACATCGCCGACTACCTGCCCCGATAAGTACAAGTACAACA
TTTCCGGGTTCAACCCCGAAACCGATAACGTGGACCCCACTTACGCGTACATGAACA
GGAGGGTGCCCCTGACCAACGTGGTGGATCTGTTTACCAACATCGGGGCCAGATGGTCC
GTCGACCAGATGGACAACGTCAACCCCTTCAACCACCACCGCAATTGGGGGCTGAAGTA
CCGCTCCCAACTGCTCGGAAACAGCCGATACTGCCGTTTCCACATTCAGGTGCCTCAGAA
ATACTTTGCCATCAAGAATCTGCTCCTGCTGCCCGGCACCTACACGTACGAGTGGGTGCT
CAGAAAGGATCCTAACATGATCCTGCAGTCCAGTCTCGGGAACGACCTGCGCGCCGACG
GCGCCTCTATCGTCTATTGGAAGTGAACCTGATGGCCAATTTTCATGCCCATGGACCACA

ACACCAGCAATCAGCTCGAGCTGATGCTGAGGAACGCCACCAACGACCAGACGTTTCGCG
GACTATCTGGGCGCGAAGAACGCGCTCTACCAGGTGCCCCGGGCTCCACCGCCCTCACC
ATTAACATCCCCGCCAGAACCTGGGAGGGAATGAGAGGATGGTCCTTCACTCGGGTGAA
AGCGTCCGAGACGCCGCAGATCGGCGCTCAGTACGACATCAACTTCAAGTACTCGGGCT
CTATCCCCTACTCGGACGGTACCTTTTACCTGACCCACACGTTCCGCAACATGAGCGTG
TTTTCGACACGTCCATCAACTGGCCGGGCAACGACCGGCTGCTGGCCCCAACCTGTTCC
AAATCAAGCGCAACGTCGGTATCGACTCAGAGGGCTTCACGATGTCCCAGTGCGACATC
ACCAAGGACTGGTATTTGATTTCAGATGGCCACCAACTACAATTACGTGTTCAACGGGTAT
CGGTTCTGGCCCGACCGTCAGTACTTCCACTACGACTTTTTGAGAAATTTTCGATCCCATGA
CNCGTCAGGGTCCCAACTTCCAGGACTCTACCCTCTTCGATCTCAGACTTACGAACCCA
CCCTTCCTCCGGCGGCGGGAGGTGTGCAGACCGGTCAGGACGCGGTGCGTAACAACCTCG
GGCTACATCGCGCCGCGCAGCTGGCCCGTGTACAGCGCGCAGCAGGGAGAGTCCTGGCC
CGCCAATTGGCCGTACCCGCTCATCGGCACCGAGTCCATTCCGTCCACGCAAATCGTCAA
CTACAAGAAATTCCTGTGCGACAACCTACCTGTGGACCGTGCCTTTTCAGTCCGATTTCAT
GTACATGGGCGAACTGACGGACCTGGGTCAGAATCCGATGTACACCAACAACCTCGCACA
GCATGGTGATCAACTTCGAGTTGGACCCCATGGACGAGAACACGTACGTCTACATGCTCT
ACGGCGTGTTTCGACATGGTCCGGGTGAACCAACCCGAACGCAACGTGCTGGCGATGGCC
TACTTCCGTACGCCTTTTCGCGACCGGTAACGCTGTGTAGTAAATGCCTGATCGTGCCCGT
ACTACCGTTTTAGATGGCCGGAACCACCGAAAGTCAGCTGAACCAGCTCGTCGGGGCGAT
GAGACTCCGGCACCGGTTCTTGGGCGTGTTTCGACAAATCCTTTCCCGGGTTCCTCGATCC
CCACCGTCCGGCCTCGGCTATCGTGAACACCGGGTCCCGAGCCTCGGGGGGCATGCACTG
GATCGCCTTCGCCTTCGATCCGATCGGGCGAAAATGTTACATGTTTCGATCCGTTTCGGATG
GTCCGACAGGGAACCTGTGGAACCTGTACAAGGTCAAGTACGACGCGTTCTTGCGGCGGA
CGGGTCTGAGGCAGCCCGACAGGTGTTTCGAGCTGGTCCGCTCGACCGAAGCCGTGCGAG
TGTCCCTGCTCGGCGGCCTGCGGGCTCTTCAGCGCGCTGTTTCGTCGCCTCGTTTCGACCGCT
ACCACACGCGCCCCATGGCCGGGAACCCCATCATCGACACGGTGGTTCGGGGTAAAACAC
GCCAACATGTACAAACCGGAGTTTCGGGAAATCTTGCACCGCAACCAGGAGCGCATGTA
CTATTGGTTCATGAAAGAGAACCCGTACTTCCGCGCCCACGAAGAAGAGCTCAAACGGG
AAACGGCCCTCGACACGGTGCCTACAAACCACTACGAGCGACACTGACGCGTGTATATT
CGTTTTAAATTTAACTTTATTATTTGTACACACTCGTTCCAATAAAGAACCCTTCGCC
AAACGGCTGCGCTGGGCCTGTCGTCGTCTCCTTTGCTTCTTACGCGAAAGGTCTCCGGC
GTCCAAGGGCTGGACGGGAGCGATCACCTCGGTCTTGAATCCGAAGCGGTGCTGCCAAC
GGAACCTCGGGGACGTGGGTGCGCGCCTGCACGCCCGTAGCGGACACGACCAGCTCGGTC
GCGAACACGTAGGCGTGGCGCAGATCCATCGAGGACAGGCGCCAGGCGCAGGTCTTATC
CGTGTTACGGCGNCCCGAGCGACCGTTGGACCCGTCGGTCGCGGACGGAGACTGAGGGT
TGCAGCAGGTAAAGACCATGGTATGGGGGTACTTCTTGTGCGCTTTCATGTTCGGCGCGGG
CGCGGGCCGTATCCGAGGCGATGTCGTCGGTGCCGCTCAGCTTGTACGGGGTCATGCGGC
AGACCTGGCGACCGCTGATGGGACTCTGGGCGGCGTAATTGCAGTTGCAGTTGGTGGAG
ATGAGGATGTGCTCCTCGGCGCGACGCTTCTCGGCGTTTCGGGTACAGGGCTTTGGTCCAC

TCGAGATCGTGGCGCATGGCGCTCACGGCCTTAGCCGCGTCCGAGAACACCATGCCGCA
GCTCCCGATCGCGTGCGGATACGGGAACCGCTGTGCTCGGCATCCTTGGCGCACACCGC
GTTGCGCTCGAAGCGGAGGACCACCACTTGCTTGCCGAAACGATTCTTTTCCACCTGGCC
GTTCTGCTCGGCGATGGCGCGCTTTCCCGCTTCGCTGGTCGGATTTAGCTCCACCGTGCGA
GGCTTAGTGAACATGGCGGAGCCGTGCAGACACTTAGGCATGCACGTGCCGAACCTCCCA
TCCGTGGCGCCAGACGTGCGCGCCGCGGGAATGAACTTAGGCTCCAGGTGGGCCATGC
CGTAGACCATGGCGGCCACGAAACGACCCACTTGATTGTGAAAGGAGTCGAANCTCGAA
AAGGTAAGTCGAAACTCGGGGTGTCTTTTGGCGACGAAAGTACCTCCCAGCTTGGTCCAA
ATGGCGTCGTCGGGTCTAATGGTACACCCCTGCCACCTCAAGTCGAGGCGATCGCAGAGC
GTTGTCAGAAACTTCATGGCCTTCTGAGCGCCAAACTCTACGGGATCGTTCAGAGGCTTC
TCGATACCCTCCTCGTCTTCGTCTTCATCGTCGCTGGGCAGCGGCGGCGGCGGCGGCA
GACGCCTTCTTTTCGCTGCGGCGCCGCCATCTCAGCCTCTTCGGCGGCGCGGAGGGCGTCT
TCATCCTCCTCCTCATCGTCGGTGTCGTTACCNCGACGGTCGGCCGTTTTTTCCTTGCGCG
GTTTCTTGCCGCGGCGCGGAAGGAGCCCCCTTCGGGCCCTTCTTCTTGCCCCCTTTCGG
CGCGGTCTCCGCTGCTGCGGCCTGGACGTCGAGGTCTCTGTCGTCCAGTCCGCGACCGC
TCCTCTCTTGGTCGATTTTCGCGTTCGAATCCTTCACCATGGCGACCGTCGCTCCGCCGCGC
TCCTCTTCTTCTTCTTCTCCGTCACCCGGAGAGCTCTCCTCCGAACTGGAGAATACCTCCT
CGATCTCCAGTCTCCTCTTTTGTACCCTCGAGGGCTGACCTATTGGTCGAAAAAGAATCG
ACGTAAACGGCGAAACCCCGCCTAAAGACCCCGAGTCGGTATAAAAGCGCCCGTGGA
TGTCACTCCTCACTCTTATGCGCTCGGAGGTCGCGAAAGACGCGTCGCGACACCGCTTAC
CTCGACGAGCCGTCGACGTGGGCGACTTCGGGCGCTGCCGCCAATCCGACTCCGAGTCGT
CCGACCCGGGCATCGGCGTCTTCTCGCGCGTCCGTCTCTTCGGCGCTTGCTGGTCTCGCC
GTCGGAGCTCGCGTCCCACTCTTCTTCTCGCCCTGCAGCCGCCGACATCGCGGTTCCCTACT
TCGGTTGATTCTCCTAAAAAGGCCGAATCGACGCGAAAGCATCATGCAGGCCGCCCGA
GAGCGCAAAGCCGTGGCCACGCTAGGCCTCGTCTTCGCCACGGTCAAGGAGAAGATCGG
CTGGCGGCGGTTTCGTGGAAGCTATCCAACGGTACGTGGCTGACGCCTACGGTGCTTTCCT
GACACTCAATGCGGAAACCGCACCCGTCGGGGGCGACGAAGATAACGCCGTCAAGTGTG
CTCATCGACACTTTAGGCGAAGAAAGGGCTATTTTAGCCGCTTATCGGGTGGCGGAAGA
GCTATTAGACGATAAGCCGCTGCCAAACGACGGCGAGAACAATGGGACCGAAAATCCCC
GGGATGCCGCGCATACCCTTGGGGAGAGTCCCGAATCGGACGAGGACGTACCAAAGGCG
TCCGCCGAGAGCTCTCCCGGCACACCAGCTCGAGACCTTACCGCGGAAGCCGTCATCGTG
TACATCGACTCGGACGGCGGTTGCGAGGAGGAGGCCAGCAGCGAAGAAGAAGAAGATC
AGGAGGAGGAGGAGGACGNGGAGGAAGAAGAAGAGGAAGAAGAAGAGAGGAGGAAG
ANGAGGAGGANGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGACGACGGAACACCCGAGT
CTACCCCTTCTACCGTCATCGAAGCGGCGAATCTCTCGCCGATCGGCACCGACGAAAGCC
ACGGGGAACCCGACGGCGAGCCCGATGACGGTGACGACAGTGACGACGGAGAGGACGA
GGGAAGAAATTCTGACGAGGATAGCGGATACTATTTCGGCGGATGGGGGACCTGATCGAT
CACCGCCGCTTTCGGTGTCGAACAAGACCGACCACTCTCCCGTCGCCCCCTGGAAC
TGGTTCGCGATCGCGGTGACAGCGATCACGGTGAGCCAGATAGCAGCGCCGCTCCTTCCG

ACGGTGGTCCTGGGGAAGCTCCGTCGACCACCGACGGGGTAGTAGACGAGGAGCAGGAG
CAAGACGAGAACAAGAGGGAGAGACCGCCGTCCCCGCCGCCACCGCTCAGCCCGCTTTC
GACAAATGCCTCCAACGGCAAGCCATGATGCTCACCGGCGCTTTGAAAGACGCTTTGCC
GAGCAGGAACGCGACGTGCCCCCTCTGCGTCGATAGCGTGCAATACCAGCTCGAGCGCTA
CATCTTTAACCCCGATATGCGCGCCCCCTCCGGAATATCGCGAAGTGCGCTTTAACTTCTAT
CCGCCCTTCATGCGCCCCAAAGCGATCGCGAACTACCACATTTTTGCGGTCACGGCGCCC
ATTCCGGCGAGTTGCAAAGCCAACCGCAGCGGGAGCCAGCTCTTAGAAGCTTGCCGCGA
CATGAAAGTGTTCAAGCGCTTACCTCGTTGGCGCCTCAACGTCCAATCCGACGACGGGCT
CGGGGACGAAGTGGTACCTGTAACAGAGCTGACAGATGCCAAATTAGTCCCTCTCAAGG
ACGACGTATCGCGTTGTCAGTGGGCTAAGATGCGCGGTGAACACATCCGCTTTTTTCAGCT
ACCCTTCCCTGCACATGCCTCCCAAGATCTCGCGTATGCTCATGGAGTGTCTGCTCCAACC
TTTCGCAAACGAAAACGACAAGGCGGAACAGGTGCGCCCCCTGCGTGAGCGACGAGGAAC
TGCGCCTGATCGTAGATCCAGAGCAGAGAATGAGAGGCGAGGAACTCTACAAGGCGATG
CTCAAAAGGAGGGCCGTCGTTACCATGGCCGTGCGGTACACCGCTTTGCTCGAGCTCATG
GAACGCGTCTTCCGAGAGCCTTCTCCGTCAAAAAAGCCCAAGAAGTGCTCCATCACACC
CTTCATCACGGCTTCGTGGCCCAAGTGCGCGAAACGGCCAAAGTGAACCTGAGCAACTA
CGCTACCTACCACGGCGTCACCTACAACGACCCGCTCAACAACCTGCACGTCAGCCAAGCT
TTTCGAAGGTAGAGACAAGGAGGACTACGTGCTCGACACCGTCTACCTTTTCTTGTTCT
CAATTGGCAAACCGCGATGGGTATGTGGCAGCAAGCCATCGATGATACCACCCTGGACA
TCTACGCGAAAGCCTTTACGCGACAGCGGCGCGCCATTTACAGCCTCGGAAGCGTCACCG
AGGTCAGCAAGGTCATCGTCGACATCCTCATGGACGGGGACAGGCTCACGGAGGAAATG
CGGAAAGCCCTCCCCAACTTCGTGACGCAGAGCCAGATCTCCGATTTTCGGCACCTTTGTC
ACCGAAAGGTCGAACGTCCCCTCCATGGCCGCCCGTTCTACCCCTCCGATTTCTGTCGCCG
TTGGCTTTCCGGCAAAGCGCCCCTCTGCTCTGGGACCAGGTCTACCTCCTCCAGATCGCCT
TTTTCTCACCAACCACGGAGGATACCTGTGGGAACCGCCCGAGAGCGAAGCGGAGGTG
CCGCAGCACCGCACTTACTGCCCCTGCAATCTCTGCAGCCCGCACCGCATGCCGGCGGAT
AACGTGCTCTGCACAACGAAGTGCTCGCCATCGGCACCTTTCGAGATTGCGAGCGCCGAA
GGCAAATCTTTCAGGCTCACGCCCCGAACCTCTGGGCCAACGCCTATCTCGATAAATTCTGTG
CCCGAGGACTTCCATCCTTTCACCGTGTTCCACTTTCCCGAAAACCGCTCTTCCTTCACCA
AAAATCACACCGGTTGCGTCACGGAAAGTCCGGAAATCCTCTCTCTGATTCTGTCAGATCC
AGGCCTCCAGGGAGGAGTTTCTCCTCACCCGAGGCAAGGGGCTCTACAAAGACCCGCAG
ACCGGCGAAACGCTCACCACTTCGGTTCGGGGCAGAGAACCGTCCTGGAGCCTCCGGCGG
AGCGCCTCTACCGCCCGCTGCCGCCAGTACCTGCGGAGGAGCTCGAGCGCCGCCGAAAC
CTCCTAGGGCTCTACGGTCTGCCTGCCCTGCTGCTGCAGACCCGGACTCCCAGAGCGACT
ACGGGGACGCTGCTCTCGCGTCATCCAACCTACGGCCGATATGGCTCAGAGGATGCTGGA
CGAGAAAATCAGAGTTACCGAAGACCCTCCGGAACCCGAGAACGCCGTTCCCTTCCCTA
CGGACGCCCCGTTTCGTGGGGGCTTCGCCCGTGGCGGAGGACCTGGAAGTGAGCGAATCA
GACGGAGAAACGTTAGGAAGCCGGGACACCGAGGAGGATCTGAGTACCATCTCGGAGG
AGGAGGAGGAGGAGGACCTCGAAGAGATGGAGAAAGAGAATATCCCACCGCGGCCCTC

CTCGCTGCCTCTGGACGGGACGCGGAACCGCAAGCGCCGCCGCTCCGCATCCTCGCCCCG
GAAGGAGCTGAAGAGGCCTCCGATCCGAAAGAGAGCCAAATCCGATAAAGACGCGGAG
ACCGCGCCCGCGTCCAAAAAGCGCCGTCCTCGAGGTAAGTATAGAAGCTGGGTCAGGCA
CCGCGTGGCGATCTGCCAAGCGCTCCGCGACGCCGTTTTCGACCGAAGGCTGGCGGCCG
AAATCCTAAAGAGAGCGCGCGGTATCTTCGTACCGCCCACCGTGCTGGGCTACTACGCCC
GCAAACCTCTAGAACTTCCCGACGAAGATCACTGATCGTCGGCTTTTTTCTTTCTCCTTTC
CTTCTTAGCGGCTCCCGCTACCGCCTCTGACACGCTCCCTCCGCCTCTCCCGCCGAAAAA
ACGCCCCAAAAATACGCCGCGGACCGACTCGTCCTTCGAATTGGTCCCTCCCGAGGTGCG
AGACTTGAAAGCCAACATCCTCGACGTGCTCGTCGAAATCGAAAATATCGCCAAAAACG
ACCCTTCACGGCGCGTTTCCATCCGCAACCGCACCCGGGAAAGCATCACTCGGCAGTTAC
ACTACGTCAAGGACGAGCAAAAACTCACCAAGCTTAAGGCAGATGCGGAAAAAATCCTG
CACCTGTGGAAATCCCTTTCCTAATCCCGCTTCTTTTATAGCGCTACAGACCGCGTGACTG
AGCCCGCGGCAACATCATGAACCTCCTCGAAGCCACTCCTACCGAGTACGTGTGGAAAT
ACAACCCCTCTCCGGGATTCCCGCCGGCGCGCAACAGAATTACGGAGCGACCATAAAC
TGGGTGGTGGCCGGAGGCAACAGTTTCGCTTACGCGGCGGACGAGATAAGACGGGCACAC
CCTAAGCCCTGCCGCCACCCGCGCGATCACCGAACGTTTCGAAGCTGAGTCAGACCAGC
AACCCTTCGCCAACGCCCGGAAACCGCCTACATCACCGCCAACGTGCTGGACTCTGGCT
TTCCAAAGTCCGCCGTGTACCCCGTGGACCCTTCCGGAGTTCAACGGGTTTACGCTCTCGG
GCGGCGCCGAAGGCCGGATGCAACTCGCGGGTGGCCTCACCGAAGGTGAGTGCAACTT
TCGGGAGGTGTCCTAGGACACGTGCTGCCTCCTGGGGGGCGAAGACGCGCCGGCGGGCG
TCCGCCGCGATGGTGTGGGACNGCTCTCGCGGGAAACGGGCTTCCCGAGGACGCCGAAG
TGGTTTCGGATACCTACAAGTACTTCTCCGCACCCAGGGACCCAGCCAAGTCGTGCAAG
AACCCGGCGTGTACTCGCGGAGGCAGTTCATGACCACCTTCTGCGGGCCGTGGTGCCCC
GACCTTTCAGCAGCCCCAATCCGCGNGACTTTCGCGCAGTACAGCGCCATCTACAAAG
GCACCAACGCGTACGAGGACGTATTTTGGGACTGGTGAAGTCCCTCTCCGCGGCTTACCC
GTTGCTGACGGTGTCTGTTCGCAATAAAGTTCTTCCAATTCAGCCTCGCTGAACGGTTC
CCGCCTCGTTATTGTCACGCGTTCGCCTCCGTCGCTCACACGCGCGCGCGAAACCGTCTT
TTGATCCAAAAGACGTAACCGGGGTTTAGGGGTTGCGCAAACCTCACGATCGCCTGGTCG
TTGACTTTCAACCAATATTTTTTAGGAGCCTGCGACTCCGTCTCCGACATGGCGACCTCGA
CTCCTCACGCCTTCTCCTTTGGCCAAATCGGCTCCCGAAAACGCCCTGCGGGCGGCGATG
GCGAGCGAGACGCCTCGAAAGTGCCGAAAATGCAGACCCCGCTCCGAGCGCGACCGCC
AACGGAAATGACGAGCTGGACCTGGTCTACCCCTTTTGGCTCCAAAACGGCTCTACCGGA
GGAGGAGGAGGAGGAGGCGGCGGTTCCGGTGGAACCCGTCCCTCAACCCGCCGTTTTT
GGACCCCAACGGACCCCTGGCCGTCCAAAACAACCTCCTGAAGGTCAATACCGCGGCCC
CCATCACCGTCACCAATAAGGCCCTGACACTCGCCTATGAACCGGATAGTCTCGAGCTCA
CTAACCAACAGCAACTGGCGGTCAAAATCGACCCCGAAGGACCTCTGAAAGCCACGACC
GAGGGAATACAGCTGTCGGTCGACCCTACGACGTTGGAGGTTGATGACGTGACTGGGA
GTTAACCGTGAAACTCGACCCCGACGGCCCCCTGGATTCTCAGCCACAGGAATCACGGT
CAGAGTCGATGAGACCTTGCTCATCGAGGATGATGGATCCGGACAGGGCAAAGAACTCG

GAGTCAATCTCAACCCACCGGACCGATTACGGCCGATGAACAGGGTCTGGACTTAGAA
ATAGACAACCAGACGCTCAAGGTCAACAGTGTTGTTACCGGCGGGCGGCGTCTAGCTG
TACAACTCAAATCCCAAGGTGGTCTTACCGCACAGACTGACGGTATCCAAGTGAACACTC
AGAACAGCATCACCGTTACTAACGGAGCTCTGGACGTGAAAGTAGCCGCCAACGGACCT
TTGGAGTCAACCGNCACCGGGCTCACACTCAACTATGACCCCGGAGACTTCACAGTAAAT
AATGCGGGCAGTTGAGCATTATCAGGGATCCGGCTCTCGTGGCCAATGCGTACCTCACA
TCCGGCGCCTCCACCCTTCAGCAATTTACAGCTAAGAGTGAAAATTCCAGTCAATTTTCTT
TCCCATGCGCATACTATCTGCAACAGTGGCTTTCCGATGGGTGATTTTTAGCTCCCTCTA
TCTGAAGCTCGACAGAGCACAGTTCACGAACATGCCAACGGGTGCAAACATCAGAACG
CCAGGTACTTTACCTTCTGGGTGGAGCGGGCACTTCATTTAATCTTTCTACCCTTACCGA
ACCCACTATTACACCCAACACCACACAATGGAATGCATTCGCCCCTGCCCTTGATTACTC
AGGTGCTCCTCCCTTCGACATCTACGACGCGTCTTCCGTAGTTACGATTTATTTGAACCC
ACCAGTGGTCGACTGGAAAGCTATCTCCCCGTCTTACCGATAACTGGAGAACCCATTCT
NCAACCTACAACCCCGGCACCGTCACCCTGTGTGTAAAAACGGTAAGGGTTCAATTGAG
ATCACAAGGAACCTTCAGCACTCTAGTCTGTTACAATTTCCGCTGTCAGAACACGGGCAT
TTTTAACAGCAACGCTACAGCGGGAACCATGACACTTGGACCTATCTTCTTCAGTTGTCC
CGCCCTAAGCACAGCCAACGCTCCGTAATTCAATAAAAAAAAAAATGAAACACACAATGT
AAAGGTCTACTGTGATTTTTTTATTAAAGAGTCAACCATACTAAGTCTCTTGATACCCAT
CAGCCTGTCCCACTCTCCGCGTTGCCAGTAGTACAGGCAGTTCACGGCGTCCACGTACCA
CGATTGCTCACCAGAAAGACCCGCTGCGCGGGAAAATCCACCATCATTCTGCGGATGTA
GTGACAAGGGAGCGCCCCCATCTGGCCGAGCGTGGCCACCGCTTCCACGAACACACCGG
TGTTGTGCGGAGGTACATAGATGATCATGCCCAGAACTCCTCCCGCGGGCACGGCGCAG
AAGACGGGATAAAATTCGGTAAACATGACGGCGGGCCACGCCGCTACGAAGTACACCCC
TTCCAGACTAGGGTGCCTTCCAGCCTGCTCCAAAGGTACACGGAGAGACCACTGCTGTC
GGGTTGACTGCACACGGCCATCGGCACGCGTCTCATCTCAAATCCGTGGCAGTGACACCG
CTCCGGAATCATCTCGAATTCTTCCAAACATAGAAAACCTGGTGCGCGTGGACGGCCGGCA
CGAAACGCAAATCTCCTTCCCCTGCTCCCGCCGCGGGTTGATGTTCCCCTATGTCTTCGCC
CCATAACCTCTGAGCGGCCATGATCTACACCTGAGATTCTTCGCGCTCTATCTCTGTATAC
ACGTGTTCCGCAGAGCCGCCGTAGACCTCTTCCTCGTCGCTACCTGCCGGTGGCGCTCTC
AGCAACGACAGTTCCAGTGGTGTGCGCGGGCGGTGGTACAGAAGGAGGCGGTGAACGGGT
ATCCGAGCGGGAGTCGTAAAACGGATTGCTGCTCACAGTCCAATTGGGGGAACGAGCGG
GAAACTGAGACAGGGAACGCAGCCAGGAGAACCGACGTGATGGCTCGCGGTATTAGGC
AATGGTGGGGGTAAAGCAGAACACCGGCGACGGATACTCAACGGTGTCTCGGATGCTC
TTGAGGACCTCCCGCAATGATTCTCCGCCACTGCACGATCAGCAATACAAACGCGATCGT
GGCTAGAAGAGTGCAACAGCCAAACATCATAAACACGTAGGGAACGGCATGTAAATATT
GACTGAGGAAGAGATAACTGGCGGCCACCGCACCGCAGTGAATGAGTCCCACGGTCACA
GCCAGAAGCAGCAGAAGGCATGCCTCTCTGCGGCGTTGGCGGATCCGCACCTATCAATA
GAAAAAAGGGGACTTTCTATCACCTCCACGCGTGCCCGACGCTTGGACATGCAATTCG
CAAATAGGACAACTGAGCTATAGTGGCTAGGGGCAAGGGCTGTCTAAGAGGGCATCCGG

GGCAAGAAGCTTCGGGGTGATGGTCGCAGTACGTGCCGTGAACATGCAGTACCCATTCTT
CTACATCCACAAACGTGGCGGTACGGAAAGCGGGAATGTAGCATAACCCCCGCGACACC
ATGCTCCAGCAAGCGGGGTTCGGCCATCTCTTTCAGCATGGATCGGGTCATCAGAGGCTGG
GTCACGGGACTGCCCTTCCCGCAAGTCTTAAGGATAACGGTCGCCACCACATTGGTGCGA
CACGCACCCAGGTAGAGAACGGGGTATTTCAAAAAAGGCAAGTGCTCCGGCAGACCCGT
CCGGGAAACCTCGTAACATAGGGATTGAAGGGCCAATCGGAAGGCGACACCGGTCTCTA
GAACGAGACCCGTATCTACGAACAGAAAATCGGTTTTGTTTTTGCGAACCATCCATTCCC
GATGTTTTCTCTATCAGAGGTTCCCGCGCTACAAACAGACGCCTCGAAACCGCTCGCAGAA
TCTCCTCCTTTTCCGCGGGTGATAAGGGCAACCGAGACTGCAGTCTCAGAATGACGTTCA
ACAGAACGCACGGTCCCGTCTTGAGTCTGAGATACTTCGAACACCGGCAGCTCACTACCG
TATACAGGGACTCGTGCCACGAGTAATGCTGGGGTTTATCGAAGAGACTAATGGAGGCT
ACGGAACGGCTCGTGTGATACTCCATCATGCGTTCCGCTGCTTCTTGGGACGGACCCTGT
CTGACCAGGATGCTGAACCATATGGCTCCGCATTCTGTTTTGATAGCCGCAACCGCGGGTA
ACGGCAACCACCTCCTACACGAAAGAAAACGGGGCAGGGGGGCGCCTTAAGTTACTCAA
GGAAACCGCCCGGGGAAAAATCGGGGCAATGAAAAGCTATCACTACCGAATCAGAAC
ACAGAGGCATGATGGCGTAACTTAAGACAGCTCTTTTATTGATCAGGTACCGTCACCTGC
AAAGATACACACATTAAACGATACGGTAAGAGTCACCGCGGTAACACCGACATCGGTAG
TGGCAGAATATATAGAGCACGACTGCTGCCGTGAACAGAGCAGCTACGACACCACCCGT
AACAATCGCGAGGCGCGCGGCATCGTCTTCCCAAAATTCACGGATCAGAGAGTAGAACT
CTCCTCCGAGCTGAGCAGACGTAGGGACAGGATCCCGTAGACCCATTGCTACTTTTTTCC
GTCGGATAGCGGTAGAGACCAACACAGCTACCATAGCCAAAAACACAAGCCCCACAACC
GTTAAAAAAGAGTTCCGGTAGATACACCCGAAGCCGCTACTCGAGAGCCCTCGTCTAT
GGCTCGCAAGGCGACGGCTTGAAGCCTTTCCAGCACTGGAACCGGTTCCGTTTTCGTTTAG
CTGGACGGTCACTACCTCCTCTTGATCTGACCCGTTTCGCATTTAACATGGACGCGGTTTCC
GAAGTGCTCCAAAAATCGCTTGAACCTCGGTGTAGCTGCTGAGAAATTCAGGTCGAAAC
GGTCGATGCGGAGTCTAGGAACAGTCGATGGTAGAGTTCAAAGACGCAGTAGGTTCTGG
CGGGAACCTCCACAGAAACGGGTTCCAGTGGGCTTACCGTTACCTTCAATTTTATAACTTC
AAATTCAAGAAAGAATTCCAGTTCGAATACGTCGGCATTAAAGAAGGTGACGGTAAATT
CTTTCTTCATTCTGTCCAATTGGAAGACACACTGCGCAGCTGTCTGACACACGTCCCAGA
AACTGTACAGTTTATGGGTCCCCGAAGAATCCGTAAGTTGGATACTCGTCAGCCAGAAAG
GAGACTCATTGCTAAGATCTACCTTGAGTTTATGTCCCACTTTCACTTCTACATCAGCCAG
CTGGAGCGGAATCATAGCTATCGAGGCATCTCTATCCGCCAGGCAACCAGACTGAGGAG
GAACACTGACTTGAGATCCGCCGTTTCGGATTTAACATCGTGCGATAACTCATTAGGGGGA
ATCGCTCCTTGTTACCATGCAGTAGTGCGCAGGCCGACCGAACGGATCTCTTGTAGGGT
TACAGTGCATGGTACGCACACACCCTCCAGTCATTCCAGTCATTACTTTACGGTCCTTTAT
CGAGGGAGCGCTTGACGAATCCTGATAGAATCCCTGTGGTGTGATCACGTACACCAGGT
AGATACTTGCAGAAGGATTCCAATGACGGATCCACAACACCTCTTCTGCAAGCTCGGTGT
AACCCACCGCGGTAAGTAGGATCCACAACACCTCTTCTGCAAGCTCGGTGTAACCCACCG
CGGTAAGTACATCATACCTCCCATAACCGAAGTGTTTGCTCACTGTAACCTCCGATGAACA

TTCGACTCCCCTAGAAAGCTACTACTATGATCATGATCGGAGTTACAAAGTCCTGCTTGA
GTACGGGTGAGTACGTAATCTCAGTCATGTAGCTAATGCTAATATGATTGAAGTAGCTAG
CGTATCTGTAATCTCGACTCATAGTATACCCATTCCAAGTGCTCCGGACAGGACCCACTT
TGAAACCCTCATTAAGCAAGTGAAACATGGGTAACCCAGTTCTCACATCCAAAGTCTTTA
GAAACTTCGGTACTATCAATCTATGAAAACATCCGCTTTTACTCCACGTATCTCTCCATGA
GAATTCTTCGCAGACCGTCTGTCCCATATACTTTCTGCACACACTCTTCCCGACCATCCC
CCATGAATCCCACAACCTTCTACCGCCCTTATCCTCCAACATGATATCCTCAGAAGCCGTA
TACCTCCCGTAATCCACGACCCCTTCGTTTTTCAGGACTGCCACGTAATCCGCATCATTTT
TATCTAAGCCTCCGGTAACAAACGTGGGCTCTAACCCGACTATTCTGGTACACCGTCTAT
CCCTAGAAATATATGTCCACTGTCTGCAGATAGTAGAGCAAGCGTGAGCGCCGGCAGAA
TGTCTATACAGTGTAACCTTTTGAATGTGGTATGTCCGACAGAACTTCCCGAAATCA
ACATACAGACCGTCATAGTCGTAGTACAGGTTCCAGTCCACCAGGAGCAGCGCGACTGC
AGGCGTCATCTTCTGATGGAAACGCAACACCTTTCTAAAACCTTTGATAGCCCATGTAATA
CCCCGGTATAAGCACAAATGATATCGGTCTTGCCGGCTAAAGCACTGTGCAATCGATGGTA
GACACCGTATTGGTACGTCGCGTCGTGAAATTTCCGGCACACCCCGTGAGCTCCATACCA
CGTAATCTTCGATGGCGGTCCGCTCAATCTTCCCACGCCTCTCGGAGCATCAAGTTTTAG
AGAATCCGGTCTCGCCACGCATGACCGATTGCCCCGAATCGGGACATGCAACTGCCGATTT
CGCACCCGAAATCACGGAGGCTCCGAAGAGCACCCCGACCAACTGAAAACAGAACGCAT
GATTTAGACCCACTCCCCAAAACGACAGAGGATTAACGCGGCCAGAGCAAAAAGGGAT
AGCAAAAAAAAAAATCCTTACCACTGAGAGATTCATAGACCGAAGAGTCNAGAGAGCAC
GTGCGAACCAGTGGAGTTCTCCAGCACGACTGTGTCAGANCGATGAAGCGGCACTCAAT
TTATACTGTCAAATGGTTAATGTTTAAATACCAGAAAGTGCTGACACCCAGTAAATATTT
ACTTAGTTTGCAGTTCCACTGTTTCCTTATTGCCGTGACTGGACAAAAACCGCAGATAAG
ATGTTCCAGTCAAGGGAACCCGATGTTCCCTCGATAACTTCCCGGTACAAAGTCCAAAAA
TAGAACTAGGTGCTTTATAAATACTAAGAGCCGACTCCTTGGGTGTTTCAGAAGAACACA
GACGATCTAAAACAAACAGGATGAACCTCGGAAGACTCAACACCGCCGGTAAGAACATC
TTAATTTTTTACTTTGTATGATTTTCAATTCTGAAAAACACGTTTCCTGGTTCGTGCACGT
ACGCGGAAACGAAGTTCGAAAAATCAGAGTTGGAATTTTCCAGCTATGGTTAACTATTAA
CTATATGACGTCACCTTAGTTAATTATTAACGATATAAAGTAAATGATTAACCTCGGACTAG
TTAATGATTAACCTATACCTGGTTAATGATTAACCTATACCTGGTTAATGATTAACCTAGACTT
AGTTAATGATTAACCTAGAAGTTAATGATTAACCTAGAAGTTAATGATTAACCTAGAAGTTAA
TGATTAACCTAGAAGTTAATGATTAATCAGNAGTTAATATTACGTCACCTCGTTATATATTA
ACTAGTGACGTCACCTCGTTATACATTAACCCATTACGTCACCTCGTTATACATTAACCTAGTG
ACGTCATGAGTAAATCATTAACCTTCATGCATATGCATGAGGAGCTACTGAATATGCATG
AGAGCCTCATACATATGCATGGAACCTTATGCATATTCACGACACTCATGCATATGCATGC
ATTGGTTAAAGAGTAACCCTATGACTCAGTGTGTATGTTTACGTTGCCTAGCAACGTAA
TGATTTACCTGCTGACGTGGCAGCTCCGCCTCCAGGTAAATCATTTACCTGGACTTTGTTT
TTTATGTTTATTACCATGGCAACGCTACCATATATGGACATCCGACTCCGCCTACCCCGT
TATACATTAACGATGGCGTGATAGGCGGAGCTCTCTCCCATTTGGCTCTCAATGACGTAGT

TCAGGTTAACCATAAGCCAGAACCGCCTATATAGGTAGAGCAGGTAGACCCGGAACACC
ATTCCCATCCGGACCTCCATAGAGTGCGGACCTCTACGGGCTCTCCATACCGGTAAATAT
TTTTATTCCATTTAATCCAATCGAATAAATCAATAATCAACTCAATGCTGTGATTCTGCCT
CAAATTCAATGGTGATTTTCTTTAATAAAAAGCCCACCCCCCTTGGCACCCCCCTGTACA
CCCCCTGTACAGGCGCCACCCCCTATGGACACCCCCCTGTACAGGCGACCACCCCCTA
TGGACACCCCCCTGTACAGGCGACCACCCCCCATGGACACCCCCCTGTACACCCCCCTGT
ACAGGCGACCACCCCCTATGGACACCCCCCTGTACAGGCGACCACCCCCTATGGACACCC
CCCTGTACACCCCCCTGTACATTTTCTCCCATAGGCTACAATGGAATACTGCCCCCTAGTG
TCTCCTGCTGTATGGGACCCCTATGATGTGGGCGCCATTACCTTTGCCACTATGGAGCTCC
TCCACGAGGGGGCGCCGTTGAAATTGGGAGACCGCATAGAGAGCCTAGCCAATGGGGTG
CTTTGGAATCCGGATATCCCCGCCAGCTCTTCAACTGCCTTTCCATTGCTCATGGGGAT
CACATGGGAAGCGCGTCATGTTCCGTGGCCACACCTACCGGATGTACCACGCCCAGTTAC
GGGTCCGAAGCTCCGCCCCCGTTACTAAGAAACAGGCCGGAAGCCTGCTCCTCAGCCTAT
CACAGAAGCTCCTCTGTTTCCCCGCCGCTTTAATACCCACCCCCTCGTGATGCAATTGGG
GGGTGGAGTCTAACCTATGGGTCTACCTGTATATACCAAGAGGGCCCTCCGGATGGCGC
TAGAGAGTATGCGGGTGCGCATTGCCCTGACGGCCTGAAGGTGGCGCCACCGGAGATA
GGCAAGACCTGTACGGTGAAGCCCCTCAAGACCCCGAGACCCTCCAGCAGGGGGTCTT
CAGTACCACCGATCTAAAAAGGACACTTCCACAATGGGCTTTTCACCGACTTTTAAACCA
AACCCCCTATATTTGTGGATGGAAAATTGGCACCGCGCCAGAGGGGGCGGAGAGTTGGA
TCGTTACGCTCCACCCCCAGCCATCGACTCCGCCCCCACCAGGACCAAGACTCCACCCA
CTCTGCAGGACCTTGCCCGGCTGGGCGTGGTCGAGCAATGCCTCAAGATGAGGAGGCGT
GGCCTGGACCGCAGGCACCACCCCTATGCTCAATAAACCAATCAGATTGAGTACTTGGC
TCCTCCTATTTGTGGGCGGGACTTTGCAGGGAGAAGTATAGCGCCCCCTGGCGGCCGTGG
GCCGCCACTGCACCCCTGTCGGACTTAGTCTCTGGCGCGGGGCGGTCAATCGCGCCCC
CTGGCGGCCGAGGGCCGCCACTGCACCCCTGTCGGACTTAGTCTCTGGCGCGGGGCGGT
CAATCATTAAACCCGACGGCCGGCACGGGCGCCCCCTGGCGGCGGGCGCCCGGCACTGCAC
CCTGCGCCTCTTAGAGGCGCCCCCTGGCGGCCGAGGGCCGCCACTGCACCCCTGTCGGAC
TTAGTCTCTGGCGCGGGGCGGTCAATCATTAAACCCGACGGCCGGCACGGGCGCCCCCTG
GCGGCGGGCGCCCGGCACTGCACCCTGCGCCTCTTAGAGGCNCCCCCTGGCGGCCGAGGG
CCGCCACTGCACCCCTGTCGGACTTAGTCTCTGGCGCGGGGCGGTCAATCATTAAACCCG
ACGGCCGGCACGGGCGCCCCCTGGCGGCGGGCGCCCGGCACTGCACCCTGCGCCTCTTAG
AGGCNCCCCCTGGCGGCCGAGGGCCGCCACTGCACCCCTGTCGGACTTAGTCTCTGGCGC
GGGGCGGTCAATCATTAAACCCGACGGCCGGCACGGGCGCCCCCTGGCGGCGGGCGCCCG
GCACTGCACCCCTGCGCCTCTTAGAGGCGCCCCCTGGCGGCCGAGGGCCGCCACTGCACCC
CTGTCGGACTTAGTCTCTGGCGCGGGGCGGTCAATCATTAAACCCGACGGCCGGCACGGG
CGCCCCCTGGCGGCGGGCGCCCGGCACTGCACCCTGCGCCTCTTAGAGGCGCCCCCTGGCG
GCCGAGGGCCGCCACTGCACCCCTGTCGGACTTAGTCTCTGGCGCGGGGCGGTCAATCA
TTAAACCCGACGGCCGGCACGGGCGCCCCCTGGCGGCGGGCGCCCGCACTGCACCCTGCGC
CTCTTAGGGCGCCCCCTGGCGGCCGAGGGCCGCCACTGCACCCCTGTCGGACTTAGTCTC

TGGTGCGGGCCCGAGTCACGGACGGAGTAGTTTCCATTGCTGCCAGCAGAGGGGCATACC
TTTATTCTCAGCTCGCGAGTCTCAACAGATACACACCTCATCGGTGTACAACGTGTCCGC
GTATCTCAGCCCCGTGCACCTCAGCCAACCACCTATATCGCGAACGGCGCCGGTACTCAC
TATGTATTTCCCGACGCGATAGTTCGGATCATTGCACCACTTATTCAAGTACATTCTAAAC
CATTGCCCTTCTGGGACTTGCCACTGATAAAAGCATTCCCGAAAGTACCGCTTCACCGCG
CGAGAACACTTATACAAGTATCTGTCCCGCAGGTTGAACATGGTTAAGCACAGAAGCAA
GGTCATGTGGCAAGAACAAGAACCGCCAGGCTGCAACCCACGCAGTATCCCATCGGAT
GACCGATCTCCGAGTTTCGCCTCCTCGTGGAACGGGTACCATAGCCGCTTCACATCTTGAA
CCAGCTTCCAGAAAACCGCATCATGCATGCACCACGGCGGCACGGCAACTCCGAAGATC
ACGTACAGTGGCATGTTCCGGAAACATCTACGACACAGGTAAGTGTGACACCTTGCGCGTA
CGCGAAAAGGGAACCCGACCCTCCCCTGCAACGCTCCACTTACGGACAGCCGGCGATGC
GCACTGCGAGCGAACAATAAATCTGCGGCGTTGTGCGCTCTAGGCGGAAGCTGGGGAAA
TATATATAGCCGACTCTTATCTTTATTGCTACCACGCCCCGTCCTATCCAGATTTGAAAC
CTGCTGACACCACCGGAACACGCGACCTCGCCCTCTCTTTATCATCCCTACGCCAGGTG
ACTCAGTCAAATCCCTTCTATAAAGACCGTTTTTACCTGACCGCTTCCACGTACACAAGG
CGGCACATGAAAGCACCATGCTGCGCCCCGTATCCGCAATCGCGTTCTCTCGTGCCAT
GTCTCACGCGGACCGCGCAACAGGTCGGTAAGTCCTTTAATCTTACGACCCACTCCAACC
TCACTCTGCACCCGCAGACCAAAGGAACCTCAAAGCAAGAGTGGCGGCTAGGGCGCGAT
ACCAAGATTGCGATGTGGGAGAAAGGCTACGGATACAGTACCCGTCGGGACCCTTTAA
AGGCCGCGTAGAAATGAACGAGACCAGTGTACCCTCTTTGACCTCCGTCCCAACGACTC
TGCCATACTGACTTACTTCTCCGAAGATAGCTCCGGCACGGAGAGTGAATATCCGTACGC
CATCAGCGTAAGAGGTGAGCCGATACTTCCCTACCTATTGCTCCATTCTGCCCATCGAGC
ACCTCATAGCCGACACCCAATACACATTTTCAGATCCCCTCCGCCCTCCCATCCTTAAGA
CGGCTGATGACTAACAATTCCCGTCCGCGGACCGAGAGCCGCATCAGCTTGCAAGTGCATC
GCGCTCGATAACGATAGTTCCATTACGTACGCCTGGTACACTGACACCTTAGAGAGCGGG
GACAACATCCAACAAGTAACGGTCCGAACGGATCCTGAGGTAGCAGTTACCTGTGCGAT
ATCGGATGGACATTCCAGCAATTCCGCGACTCTCGTTGTACCACTAAACCGAGGTCAGTA
GTATTCCCCTCCCTCACCAGCAACAGATCCGCACAGTAAGGATCATGTCAGGCTTTCACGA
TCCTTTCCCCACTCCTTTAGAACCTGCCGCTCCCTACGGCGCGGATATGACTACGGTGTTT
CTGGCCATCTTAGCCCTTATTCTTCTATCCGTCATCGGCGGCTACGCCCTCAGAAAGCTGT
GTATGCGAAACGAGCGCGTTTTTATTGTAAACCGTACAGAGAATGTTTTGGTGGTCATC
TCTAGGACAAATAAACTTCTACTTGAAATGAGTTTATTTTTTTTCCCCCTGACTGTTTGTG
ATGGGAAATGATCGGTGCTGCTTATGGACCGAGATAGAGGGAAGGGACGGGGGCATTTT
CCCCCTCCACAGAACCCTCCACCAAATTTCTCGGTCCAGGGGCATAAGAAAGAGATCA
AATTTACATCTCCGGTAAAGATCACCTCTATAACCCCGGACGGGCGGACACGCTGTGAAT
CCCAGCACTCCCTTCCGATACGCAAACTGACTTGAGCAGTTCGGCCCTGTGTACAGACAA
ACGGATGATCTCTGAGTTCCCAACGGCATTTTCAATTTATTTGAATTTTCAATTTATTTATTT
ACACATTTACACACTGTACACGGTCATTTCGATTTTCATTGCCAGACAGAAAGACTAATCAA
TGTCCCCTTTTCACTATGTGGACTGTGACAGCAGGGTCTTCGCTCACTTCACTGTCCGTGTC

ATCCTCTCTACGCCCACACAGCATCGCCCGATAGTGAAAAGCTGACACTCAGCATGAGAAC
CCAACAGCAGGAGCAATGTGAGAGGTAGCCACACAGGAAAACTTTTCTCTTCTCCCTTCA
GACCCCTCCCGTCGAAACATTGTGATGGACTACTGGTACTTCGCCCTGAGGTTCCCAGG
TAGGAACGACCGTAAGGGTGAACCTCTGAACGCTGTTCTGCATCAGGTCCCGTGTCACTT
GATACATGCCGGAATCCGCGCCACTTAAGTTCTTGATAGTCACGCAGTTCTCGGATCTGT
TATACGACAGCCTCCCTTGATACGCCCCGTAGACCATCGGCTCCTTCAGCGCCTGGTAGT
CCTGCAGCACGAACTTGCGCACGGCGCCCGCATCCATCGCGGTCACTTCCCATTCTCTGA
TCTGAAAACCTCTCGGTAGAACCGCACAGAGTCACAGCATCCCGTTCGTTAGCCACGACCC
GGGATACGTTCTCCATTTTACCCGTACCGTTCTCGGGAAGCCCCGACACGGTGAAATAGG
CAGTCTCAGGCTTGAACCCACCGCGAATGATTGTGATAGCCAGCACCCGTTATTAGCTT
TGATTGCTTCGACATGCATTGAATTACAGGATGAATTTAGCCGCGCCCTCGTCATATAGC
CCAGATCCAGCCCCTCTTTGATCGAAGGAATCACGAAAGCCACTTTCTGCCATCTGTTAC
AGACCTTCCCCGGAGCGTGGTACCATAGCAGCAGCGTGAAATCAGCGCATCTGCCCGTA
GTCAGAGTCACCTCCTTACGGCCCCCTACGGCGGCACCGGAGACGGTGCCAGACAAGCA
GAGCAGGTGCAGTGCGACGGCGGCACACAGCAGGAGCGAGGCCATGACTGCGGAGTCC
GAGCCGAGCGGTGTGCTGCTCGATCCCTCCGCTACCTTTTTATGCNCCACGCACCTCTATT
GTCGGTCACACATTAACCTCGCCCCGTACGCGAAACACCTGAATAACCTATGCCCTTCTTC
CGCTCGGTCAGCACCGCGCCCGCGACCTTTGAACGAACACGTACACTGACTTCCGCATAG
GGAGCAATAAGGAAGTCAGATAGTGAAAAATCGATCCTCGACACACCCACACGGAAACG
CTGACCTAGGCGAAACCTCTCAGGTAAACATTCACTATACGCACCACGCCTTGAATAAA
CAGTTACCCATACGGGCTATATATTCTACCCCGACTGCAGGCAGCGATCAGGACGCGTCC
ACAGAGAGATCCGTGCGCGACCGTCTGTCCGGGCTCCTCTAGAATCAAGAACTTACCAT
AACCACGTGCAGGTAAGAACTCCTCTTCTCTTCCCTCCAATTTGATCCGATCCTTTTTTTTT
ACGCTACTCAACCGCAACCCGTTTCTTCTCCACCACAGTTACTGCTCCTTCTATGCCTTTG
CCCTCTGATGGGCAGCGGCACACTAGCACCCCTCGTCTCGGTAGACAACTCCTACTCCGC
CTGTTCCGATCCGGCGAACTCCCACTTTCTCCTTCCGAGCAACACCGCCGCCGCCGCTA
CTCCGAAACCGCGGTTCCCGAAAACCTTACCCCCATCCGAAGCCACCACGCCCTGCGA
CGACTTGCTGGAAGAGGACTGCTGGTTCGCGGAGAGCAGCGCGGANTACGCACCCATTC
CCTGGAATACCGAGGAGAACACAACCTTGGTTATTCCGGCACAGGTATCCGTTTCGCCCT
CCAAGTCCACGACGCCCCCAGCGGTCATGNTCGGCATCGCACAGAAAGCCGTGGACCGC
GGATACTCCAGCAAGGACCACACCTCCCATATCGCCACGGGCGTTACCGTAGCCGGAAT
CGCCATACTCATTGTTCTCGTCATCGTNGCCTTTTCGCACGAAGGCTAGGGAACCGCGCCC
AGTGCGCTCCATCTATCTGGGCGTGCCTCCCCCGACGTAGACCTTACCGTATAAAACCA
TAATAAAGATTCACTGTCTCATCGCACAAGAATCTTNCCGTGTCCTGTGTCTGTCTCGGC
GCCGTCCGCGGGAAAAAGGTTAACGCGGAATCTATCTCCCTGCGGATTTCCGTATCCGTC
AGTTCCTGGGCGTTTCCGAAAATGCTCACGGGAAGCCACGCCCCGTGCGGGCGTGGCTAA
CCAAAGATTGAAAAACGATCCGCGAGCGCCCTCTGCCGGCGGCGGGGAATAGGNGG
TGTGGGGGAGTGTATTTTAAGTAGATATATATAGATGATG