

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARS YÖRESİNDE SIĞIRLARDA
CRYPTOSPORIDIUM TÜRLERİNİN DAĞILIMI VE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Vet. Hek. Aysel İTİK EKİNCİ

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mükremin Özkan ARSLAN**

KARS- 2012

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARS YÖRESİNDE SIĞIRLARDA
CRYPTOSPORIDIUM TÜRLERİNİN DAĞILIMI VE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Vet. Hek. Aysel İTİK EKİNCİ

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mükremin Özkan ARSLAN**

Bu çalışma, TÜBİTAK TOVAG tarafından, 1002 Hızlı Destek programı çerçevesinde 1100451 nolu proje olarak desteklenmiştir.

KARS- 2012

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR	IV
TABLO LİSTESİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÖNSÖZ.....	X
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Taksonomi.....	2
1.2. Tarihçe	3
1.3. <i>Cryptosporidium</i> Türlerinin Morfolojisi ve Yaşam Döngüsü	6
1.4. <i>Cryptosporidium</i> Türlerinin Moleküler Yapısı.....	11
1.5. Klinik Belirtiler.....	15
1.6. Patogenez	18
1.7. İmmunite	20
1.8. Epidemiyoloji.....	21
1.9. Sığırlarda <i>Cryptosporidium</i> Türlerinin Dünyadaki Durumu	28
1.10. Sığırlarda <i>Cryptosporidium</i> Türlerinin Türkiye'deki Durumu	32
1.11. Teşhis	34
1.11.1. Direkt Dışkı Muayenesi	35
1.11.2. Boyama Yöntemleri	36
1.11.2.1. Modifiye Asit-Fast Boyamaları	36
1.11.2.1.1. Modifiye Asit-Fast Yöntemi.....	36
1.11.2.1.2. Kinyoun Asit Fast Boyama Yöntemi.....	37
1.11.2.2. Karbol Fuksin Boyama Yöntemi	38
1.11.2.3. Safranin-Metilen Mavisi Boyama Yöntemi.....	38
1.11.2.4. Modifiye Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi.....	38
1.11.2.5. Auramine-Rhodamine Boyama Yöntemi	39
1.11.2.6. Auramine Phenol Boyama Yöntemi	39
1.11.3. İmmunolojik Yöntemler.....	39
1.11.3.1. İndirek Fluoresan Antikor Test	40
1.11.3.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	40

1.11.4.	Moleküler Biyolojik Yöntemler.....	41
1.12.	Tedavi	42
1.13.	Korunma ve Kontrol	43
2.	MATERYAL VE METOT	46
2.1.	Materyal	46
2.1.1.	Çalışma Periyodu ve Odakları	46
2.1.2.	Çalışmanın Yapıldığı Bölgenin Özellikleri	47
2.1.3.	Dışkı Örnekleri.....	48
2.2.	Metot.....	52
2.2.1.	Modifiye Asit Fast (mAF) Boyama Yöntemi	52
2.2.1.1.	Hazırlanan Solüsyonlar	52
2.2.1.2.	Boyama Yöntemi	53
2.2.2.	Buzağı Altlık Örneklerinin İncelenmesi	54
2.2.3.	Dışkı Örneklerinden <i>Cryptosporidium</i> Ookist İzolatlarının Elde Edilmesi. 54	
2.2.4.	DNA Ekstraksiyonu	56
2.2.4.1.	Dışkı Örneklerinden (QIAamp DNA Dışkı Kiti Kullanarak) DNA Ekstraksiyonu	56
2.2.4.2.	Klasik Yöntemle Dışkı Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu	57
2.2.5.	<i>Cryptosporidium</i> Türlerinin Belirlenmesi.....	59
2.2.5.1.	PCR-RFLP, SSU rRNA Gen Amplifikasyonu ve RFLP Analizi	59
2.2.5.2.	<i>Cryptosporidium parvum</i> Subtiplerinin Belirlenmesi (GP60 Geninin PCR ve Sekans Analizi):	62
2.2.5.3.	Sekans Analizi (Dizi Analizi)	64
2.2.5.3.1.	DNA Dizi Analizi Reaksiyonu	64
2.2.5.3.1.1.	Etanol Çöktürmesi	65
2.2.5.3.1.2.	DNA Dizi Bilgisinin Elde Edilmesi.....	66
2.2.6.	İstatistikî Analiz	66
3.	BULGULAR.....	67
3.1.	Dağılım Sonuçları	67
3.2.	Moleküler Karakterizasyon Sonuçları	79
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	97
ÖZET	113

SUMMARY	115
KAYNAKLAR	117
ÖZGEÇMİŞ.....	128

SİMGELER ve KISALTMALAR

AE	Elüsyon Tamponu
AL	Lizis Tamponu
ASL	Stool Lizis Tamponu
AW₁-AW₂	Yıkama Tamponu
bp (=bç)	Baz çifti
CD4⁺	Yardımcı T lenfositler
Cl	Klor
COWP	<i>Cryptosporidium</i> oocyst wall protein
Crypto	<i>Cryptosporidium</i>
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GP60	Glikoprotein 60
HCl	Hidroklorik asit
KOH	Potasyum Hidroksit
IFAT	İndirek Fluoresan Antikor Test
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
M	Marker
mAF	Modifiye Asit Fast
mAF Boyama	Modifiye Asit Fast Boyama

Mb	Milibaz
MgCl₂	Magnezyum klorür
mZN	Modifiye Ziehl Neelsen
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
NaAc	Sodyum asetat
NaCl	Sodyum klorür
SAF	Sodyum asetat-asetik asit formalin
SSU rRNA(18rRNA)	Small subunit ribosomal RNA
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PGE₂	Prostaglandin E ₂
PVA	Polivinly alkol
RFLP	Restriksiyon Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribosomal Ribonükleik Asit
SLS	Örnek yükleme solüsyonu

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. İnsan ve hayvanlarda bulunan önemli <i>Cryptosporidium</i> türleri ve bazı özellikleri.....	6
Tablo 1.2. <i>Cryptosporidium</i> türlerinde prepatent ve patent süreleri.....	11
Tablo 1.3. <i>Cryptosporidium parvum</i> ' un subgenotipler	13
Tablo 1.4. <i>Cryptosporidium hominis</i> ' in subgenotipleri.....	14
Tablo 1.5. Sığırlarda cryptosporidiosis epidemiyolojisinde etkili risk faktörleri.....	24
Tablo 1.6. Asit fast boyama yönteminde <i>Cryptosporidium</i> ookist yoğunluğu ve enfeksiyon şiddeti kriterleri.....	37
Tablo 1.7. <i>Cryptosporidium</i> ookistlerinin identifikasyonunda kullanılan tanı metotlarının avantaj ve dezavantajları.....	41
Tablo 2.1. Araştırma materyali yerleşim yeri, ahır ve ahırdaki hayvan sayıları	49
Tablo 2.2. Moleküler karakterizasyonu yapılan çalışma materyalinin yerleşim yeri, yaş ve klinik durumuna göre dağılımı.....	51
Tablo 2.3. Dışkı örneklerinde <i>Cryptosporidium</i> ookist yoğunluğu ve enfeksiyon şiddeti kriterleri.	54
Tablo 2.4. SSU rRNA geninin RFLP analizi ile sığırlarda bulunan <i>Cryptosporidium</i> türlerinin band modelleri.....	62
Tablo 3.1. Kars yöresinde sığırlarda Modifiye asit fast boyama yöntemi ile <i>Cryptosporidium</i> ookistlerinin dağılımı.....	70
Tablo 3.2. Kars'ta sığırlarda yaş gruplarına göre <i>Cryptosporidium</i> türlerinin dağılımı.....	73
Tablo 3.3. Sığırların klinik durumuna göre <i>Cryptosporidium</i> ookistlerinin görülme oranı.....	75
Tablo 3.4. Sığırlarda <i>Cryptosporidium</i> ookist atılım yoğunluğunun klinik duruma göre dağılımı.	76
Tablo 3.5. Kars yöresindeki sığır işletmelerinde sürü büyüklüğüne göre <i>Cryptosporidium</i> ookistlerinin dağılımı.....	76
Tablo 3.6. Kars yöresindeki sığır işletmelerinde buzağı sayısına göre <i>Cryptosporidium</i> ookistlerinin dağılımı.....	78

Tablo 3.7. Çalışmada incelenen <i>Cryptosporidium</i> izolatları ve bunlardan elde edilen genomik DNA sayıları.	80
Tablo 3.8. <i>Cryptosporidium</i> izolatlarının SSU rRNA gen amplifikasyonu sonucu <i>Cryptosporidium</i> türleri yönünden pozitif olan sekonder PCR ürünlerinin dağılımı.....	82
Tablo 3.9. <i>Cryptosporidium</i> türlerinin görülme oranının mAF boyama yöntemi ve PCR ürünü sonuçlarına göre karşılaştırılması.	83
Tablo 3.10. Kars yöresinde PCR-RFLP ile sığırlarda klinik ve yaş durumuna göre <i>Cryptosporidium</i> türlerinin dağılımı.....	86
Tablo 3.11. Sığırlarda PCR-RFLP sonuçlarına göre <i>Cryptosporidium</i> türlerinin yaş gruplarına göre dağılımı.....	87
Tablo 3.12. Sığırlarda PCR-RFLP ile saptanan <i>Cryptosporidium</i> türlerinin hayvanların klinik durumuna göre dağılımı.....	88
Tablo 3.13. Kars çevresindeki sığırlarda saptanan <i>Cryptosporidium parvum</i> örneklerinin dağılımı.	90
Tablo3.14.Kars çevresindeki sığırlarda saptanan <i>Cryptosporidium parvum</i> subtiplerinin dağılımı.	91
Tablo 4.1. Kars'ta diyareli buzağılarda <i>Cryptosporidium</i> görülme oranlarının sıcaklık ve yağış durumu ile karşılaştırılması	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Cryptosporidium parvum</i> 'un biyolojik gelişmesi	10
Şekil 1.2. <i>Cryptosporidium</i> ookistlerinin bulaşım kaynakları.	22
Şekil 1.3. <i>Cryptosporidium parvum</i> 'un bulaşım kaynakları	25
Şekil 2.1. Materyal toplanan yerleşim yerleri	46
Şekil 2.2. Araştırma materyalinin toplandığı yerleşim yerlerinden bir görüntü	48
Şekil 3.1. Kars'ta yerleşim yerlerinde <i>Cryptosporidium</i> ookistleri görülme oranı....	67
Şekil 3.2. Kars yöresinde sığırlarda <i>Cryptosporidium</i> türlerinin çiftlik dağılımı	68
Şekil 3.3. Kars yöresinde sığırlarda <i>Cryptosporidium</i> türlerinin genel dağılımı	68
Şekil 3.4. Kars'taki sığır çiftlik/ahırlarında buzağı altlık örneklerinde <i>Cryptosporidium</i> ookisti görülme durumu.....	69
Şekil 3.5. Kars yöresinde buzağılarda ve ergin sığırlarda <i>Cryptosporidium</i> türlerinin görülme oranı	71
Şekil 3.6. Kars yöresindeki sığırlarda yaş gruplarına göre <i>Cryptosporidium</i> etkenlerinin dağılımı	72
Şekil 3.7. <i>Cryptosporidium</i> ookistleri, Modifiye Asit Fast Boyama.....	74
Şekil 3.8. <i>Cryptosporidium</i> ookistleri, taze preparat	74
Şekil 3.9. Kars yöresindeki sığır işletmelerinde sürü büyüklüğüne göre <i>Cryptosporidium</i> ookistlerinin dağılımı	77
Şekil 3.10. Kars yöresindeki sığır işletmelerinde buzağı sayısına göre <i>Cryptosporidium</i> ookistlerinin dağılımı.....	78
Şekil 3.11. <i>Cryptosporidium</i> türlerine ait PCR-RFLP jel görüntüleri.	85
Şekil 3.12. Sığırlarda PCR-RFLP ile <i>Cryptosporidium</i> türlerinin yaş gruplarına göre dağılımı.	88
Şekil 3.13. Buzağılarda PCR-RFLP ile saptanan <i>Cryptosporidium</i> türlerinin klinik durumuna göre dağılımı	89
Şekil 3.14. <i>Cryptosporidium bovis</i> 'e ait dizi analizi	92
Şekil 3.15. <i>Cryptosporidium ryanae</i> 'ya ait dizi analizi	92
Şekil 3.16. <i>Cryptosporidium parvum</i> IIaA15G2R1 subtipine ait dizi analizi.....	93
Şekil 3.17. <i>Cryptosporidium parvum</i> IIaA16G3R1 subtipine ait dizi analizi.....	93
Şekil 3.18. <i>Cryptosporidium parvum</i> IIaA15G1 subtipine ait dizi analizi	93

Şekil 3.19. <i>Cryptosporidium</i> izolatlarına ait karşılaştırılma hizalama sonuçları.	95
Şekil 3.20. <i>Cryptosporidium</i> izolatlarına ait filogenetik ağaç analizi.	96
Şekil 4.1 Kars yöresindeki buzağılarda <i>Cryptosporidium</i> prevalansı.	98

Önsöz

Cryptosporidium etkenleri; Protista âleminin Alveolata phylumu, Apicomplexa subphylumu ve Cryptosporiidae ailesinde yer alan protozoon parazitlerdir. İnsan ve hayvanlarda cryptosporidiosis neden olur ve hastalık kısaca “Crypto” olarak isimlendirilir. *Cryptosporidium* türleri insan ve hayvanların sindirim sisteminde intracellüler olarak ancak extrasitoplazmik yerleşirler.

Hayvanlarda ve insanlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları son yüzyılın önemli enterik patojenleri arasında yer almaktadır. Özellikle son 30 yıldır bu protozoonun insan ve hayvanlardaki prevalansı, epidemiyolojisi, yayılışı etkileyen risk faktörleri, bulaşım kaynakları üzerinde çok sayıda araştırmalar yapılmaktadır. Cryptosporidiosisin Amerika ve Avrupa kıtasındaki prevalansı, epidemiyolojisi ve saptanan türlerin moleküler karakterizasyonu ortaya konulmuştur. Hayvanlarda bu enfeksiyon üzerinde ve özellikle insanlara bulaşımında etkili olduğu için sığır cryptosporidiosisi hakkında detaylı araştırmalar yapılmıştır. Son birkaç yıldır ise sığırlardan elde edilen *Cryptosporidium* etkenlerinin tür düzeyinde tanımlanması, tiplendirilmesi ve subtiplerinin belirlenmesi üzerinde çok sayıda moleküler genetik araştırmanın yapıldığı görülmektedir.

Sığırlarda *Cryptosporidium parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* ve *C. andersoni* olmak üzere dört tür yaygın olarak görülmektedir. Bunlardan *C. parvum* zoonotik tür olup insanlara da bulaşmaktadır. Oldukça geniş bir konak potansiyeli olan *C. parvum* türü çiftlik ve evcil hayvanların yanında insanlarda da yaygındır. İnsanlara bulaşımında buzağular ve özellikle de klinik olarak diyareli neonatal buzağular rol oynarlar. İnsan cryptosporidiosis olgularında etiyolojik olarak % 50’ler düzeyinde *C. parvum* etkendir. Ayrıca bu türün çok sayıda subtipi ve subgenotipi bulunmaktadır. Şimdiye kadar yapılan araştırma sonuçlarına göre sığırlardan insanlara bulaşan 24 adet *C. parvum* subgenotipi tespit edilmiştir.

Cryptosporidium parvum özellikle buzağı ishallerinin etiyolojisinde primer ajan olarak değerlendirilmektedir. Patojen tür de olan *C. parvum* buzağularda önemli

verim kayıpları oluşturan enfeksiyon ajanı olarak suçlanmaktadır. Buzağılarda diğer enfeksiyöz ajanları olan; *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Clostridium* sp., rotavirus, coronavirus, parvovirus, *Eimeria* sp., *Giardia* sp. ve *Neoascaris vitulorum* türleri içerisinde *Cryptosporidium* etkenleri ilk sıralarda gelmektedir. Buzağılarda diyare önemli ve yaygın bir klinik belirti olduğuna göre *Cryptosporidium* enfeksiyonları ekonomik değer taşıyan hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır.

Tüm Dünya’da yapılan çalışmalarla kıyaslandığında Türkiye’de sığırlarda ve koyunlarda olmak üzere *Cryptosporidium* etkenlerinin cins düzeyinde prevalansı hakkında araştırmalar vardır. Ancak moleküler çalışmalar oldukça sınırlıdır. Kars ve çevresinde ise buzağılarda ve kuzularda cryptosporidiosis ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Bu protozoonun yıllara göre değişiklik göstermekle beraber bazı doğum sezonlarında % 30’lar civarında görüldüğü ve ishal olgularında buzağı ve kuzularda etiyojik tanıda dikkate alınması gerektiği vurgulanmıştır. Elde edilen tüm bu sonuçlar dikkate alındığında *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının hayvanlarda ve özellikle buzağı ve kuzularda ciddi boyutlarda verim kayıplarına neden olabileceği açıktır. Ayrıca en önemlisi gittikçe yaşlanan ülke nüfusunun gelecekte *Cryptosporidium* gibi fırsatçı intestinal protozoonlar ile karşı karşıya kalma riskidir.

Bu çalışma ile Türkiye’de oldukça sınırlı sayıda araştırmanın bulunduğu *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı belirlenmiş ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca Türkiye’de *Cryptosporidium* enfeksiyonlarına neden olan türlerin sekans analizleri ile tür konfirmasyonları yapılmıştır. Yine dünyada en yaygın olarak görülen, patojen ve zoonotik tür olan *C. parvum* türünün suptip familyaları (tipleri) ve subtipleri (subgenotipleri) bu araştırma ile ilk defa belirlenmiştir. Kars yöresindeki farklı yaş gruplarındaki sığırlarda bulunan *Cryptosporidium* türleri de bu çalışma ile ortaya konulmuştur. İleride hem bölgede hemde Türkiye’de *Cryptosporidium* enfeksiyonları üzerinde yapılacak moleküler epidemiyolojik araştırmalara ışık tutacak bu çalışmada; buzağılarda klinik cryptosporidiosis olguları ile buzağı ve ergin sığırlardaki *Cryptosporidium* türleri belirlenmiş, ishal vakalarındaki *Cryptosporidium* türü, tip veya subtipinin hangisi olduğu tespit edilmiştir.

Bu araştırma, TÜBİTAK TOVAG grubu tarafından, 1002 Hızlı Destek programı çerçevesinde 1100451 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Bu doktora çalışmasının belirlenmesi, projelendirilmesi ve yürütülmesi sırasında her konuda desteğini gördüğüm danışman hocam sayın Prof. Dr. M. Özkan ARSLAN'a, doktora çalışmam sırasında katkılarını esirgemeyen Parazitoloji Anabilim Dalı eski Öğretim Üyesi ve 24. Dönem Kars Milletvekili sayın Prof. Dr. Yunus KILIÇ'a, Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden sayın Prof. Dr. Atilla AKÇA'ya, sayın Prof. Dr. Murat KARA'ya, sayın Doç. Dr. Barış SARI'ya, ayrıca Arş. Gör. Dr. Gencay Taşkın TAŞÇI ile Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Bio. Neslihan GÜNDÜZ'e,

Tezin moleküler çalışması aşamasında, PCR-RFLP tekniğinin uygulanmasında, PCR ürünlerinin sekans analizinde bilgi ve birikimiyle katkı sağlayan Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi Cem ÖZİÇ'e,

Çalışmada elde edilen *Cryptosporidium parvum* subtiplerinin belirlenmesi ve *Cryptosporidium* türlerinin doğrulanması için sekans analizi yapılmasında bizlere imkânlarını sunan, aynı zamanda Arş. Gör. Cem ÖZİÇ'in de doktora öğrenimi nedeniyle çalıştığı Eskişehir Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü yetkili ve çalışanlarına,

Çalışmanın her aşamasında fikirlerinden yararlandığım, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Zati VATANSEVER'e, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Hidayet Metin ERDOĞAN'a Kayseri Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Alpaslan YILDIRIM ile Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Nuran AYSUL'a,

Bu çalışmanın materyalinin sağlanmasında bizlere müsaade ederek çalışmanın en temel yapı taşını oluşturan Kars yöresindeki hayvan yetiştiricileri ile çiftlik sahibi ve çalışanlarına, materyal temininde ve sahadaki çalışmalarımızda katkılarından dolayı veteriner hekim meslektaşlarıma,

Projenin tüm aşamalarında bizleri bilgilendiren, motive eden ve maddi destekleri ile katkılarını sağlayan TÜBİTAK'a ve özellikle TOVAG grubu çalışanlarına,

Doktora öğrenimim ve araştırma süresince büyük özveride bulunan aileme eşime ve özellikle kızım Elif Naz'a

Teşekkür ederim.

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

Cryptosporidium türleri balık, amfibia, sürüngen, kuş ve memelilerin gastrointestinal sistemine yerleşerek sindirim sistemi bozukluklarına ve ekonomik kayıplara neden olan zoonoz parazit protozoonlardır. Gastrointestinal sistem dışında insanlarda solunum sistemi ve konjunktivada, bazı kanatlılarda solunum sistemi, bursa fabricius ve konjunktivada, maymunlarda safra kesesi, safra yolları ve pankreasta ayrıca buzağılarda üriner sistemde de görülmektedirler (Thompson ve ark. 2005, Fayer 2008).

Cryptosporidium türleri yerleşim yerleri ve yaşam döngüsü biçimi ile diğer coccidia etkenlerine benzer bir gelişim göstermektedir. Konak epitel hücrelerinin mikrovillus kenar kısımlarında bulunan epitel hücrelerde bir parazitofor vakuol içinde intrasellüler-extrasitoplazmik olarak bulunmalarıyla diğer coccidia etkenlerinden ayırt edilebilirler. Bazen Peyer plaklarında intrasitoplazmik invazyonlar da oluşturmaktadırlar (Sears ve Kirkpatrick 2001, Chalmers 2010, Karaer ve Dumanlı 2010).

Konakta merogoni, gametogoni ve sporogoni gelişme dönemlerini geçiren parazitin, dışkı ile 4–6 mikron büyüklüğünde ve 4 adet sporozoit içeren ookistleri atılır. Ookistler atıldığı andan itibaren enfektif olup fekal-oral bulaşma biçimi ile hastalığın yayılışında önemli rol oynarlar. Ayrıca bazı ookistler konak içinde parçalandığı için otoenfeksiyonlara da neden olurlar (Tzipori ve Ward 2002, Xiao ve ark. 2004, O’Handley ve Olson 2006, Fayer 2008, Bowman 2009).

Cryptosporidium türlerinin oluşturduğu cryptosporidiosis, buzağı, kuzu ve oğlaklarda sulu-sarı ishalle karakterize şiddetli hastalık tablosu hatta genç ruminantlarda yaygın ölümlere neden olmaktadır. Buzağı ve kuzu gibi genç hayvanlar dışkıları ile fazla ookist atarak hastalığın bulaşmasında önemli rol oynarlar. Dışkı yolu ile yayılan bu ookistler dış ortamda uzun süre canlı kalabilmekte ve hijyenin kötü olduğu bölgelerde içme suyu kaynaklarının kontaminasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca ookistlerin dezenfektanlara ve sıcaklık değişikliklerine

dayanıklı olmaları su arıtma işlemlerinde önemli sorunlar oluşturmaktadır. Bu sebeplerden dolayı ookistlerle kirlenmiş suların içilmesi içme suyu kaynaklı epidemilere sebep olmaktadır (Thompson ve ark. 2005, Fayer 2008, Nichols 2008).

Patojen türlerin oluşturduğu enfeksiyonların şiddeti ve süresi, konağın immun sistemine ve yaşına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Enfeksiyonların bazıları kendi kendini sınırlayan (self-limiting) tarzda ve akut tipte iken, bazıları ise kronik tiptedir. İmmünyetmezliği olan ve immun sistemi baskılanmış konaklarda hastalık daha şiddetli seyreder ve ölümle sonuçlanabilir. İnsan ve hayvan sağlığı açısından önemli olan *Cryptosporidium* türleri daha çok bağırsak ve mideye lokalize olmaktadır. Bazı türler konak spesifik iken bazıları ise çok sayıda konakta enfeksiyona sebep olabilirler (De Graaf ve ark. 1999, Ramirez ve ark. 2004, Alves 2006, Fayer 2008, Fayer 2010).

İnsan ve hayvanların önemli intestinal protozoon enfeksiyon etkenlerinden olan *Cryptosporidium* türlerinin son yüzyılda belirlenmiş olmaları, dönem dönem salgınlara neden olmaları, zoonotik yönü, immünyetmezlik durumlarındaki önemleri ve özellikle buzağılarda neden oldukları ekonomik kayıpları ile dikkat çekmektedirler (Thompson ve ark. 2005, Fayer 2008, Nichols 2008).

1.1. Taksonomi

Cryptosporidium türleri insan ve hayvanlarda sindirim sisteminde bozukluklara neden olan protozoonlardır. *Cryptosporidium* türlerinin sınıflandırması Leger tarafından ilk olarak 1911 yılında yapılmıştır. Protozoa âleminin Apicomplexa filumunda yer alan *Cryptosporidium* türleri eukaryotik protozoonlardır. *Cryptosporidium* cinsindeki tüm türler intracellüler parazitler olup DNA'ları bir çift zarla etrafı çevrili olan nukleus içinde bulunur (Xiao ve ark. 2004, Fayer 2008).

Cryptosporidium etkenlerinin sistematikteki yeri aşağıda özetlenmiştir (Xiao ve ark. 2004, Fayer 2010, Karaer ve Dumanlı 2010).

Alem: Protista

Kök: Alveolata

Kökaltı: Apicomplexa, Levine, 1970

Sınıf: Coccidea, Leuckart, 1879

Dizi: Cryptosporiida

Aile: Cryptosporidiidae Leger, 1911

Soy: *Cryptosporidium*, Tyzzer, 1910

Tür: *C. parvum*, Tyzzer 1912

C. andersoni, Lindsay, Upton, Owens, Morgan, Mead ve Blagburn 2000

C. bovis, Fayer, Santin, Xiao 2005

C. ryanae, Fayer, Santin, Trout 2008

1.2. Tarihçe

Cryptosporidium türleri Clarke tarafından ilk kez 1885 yılında “fare mide epiteli üzerinde bulunan spor kümeleri” olarak tanımlanmıştır. Daha sonra Amerikalı parazitolog Ernest Edwart Tyzzer 1907 yılında fare mide epitel hücrelerinde bu protozoonları tespit etmiş ve Yunanca’da gizli spor anlamına gelen *Cryptosporidium* olarak isimlendirmiştir. Daha detaylı çalışmalarıyla Tyzzer 1910 yılında bu protozoonun sexuel ve asexuel gelişimini açıklayarak ookistlerin dışkı ile dışarı atıldığını ve ookistlerin içindeki sporozoitlerin serbest halde olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışmaları sonucu fare mide bez epitelinde sınırlandırılmış olan bu ilk türü *Cryptosporidium muris* olarak isimlendirmiştir. Tyzzer 1912’de farelerin ince bağırsağında gelişen ve *C. muris*’inkinden daha küçük ookistlere sahip olan yeni bir türü ise *Cryptosporidium parvum* olarak tanımlamıştır. Tyzzer yine diğer coccidia’lardan farklı olarak *Cryptosporidium* ookistlerinin konak hücresi içindeyken sporlandığını ve bununla otoenfeksiyonlara neden olabileceğini gözlemlemiştir.

Aynı araştırıcı *C. parvum* türünü 1929'da tavukların sekum epitellerinde tespit etmiştir (Xiao ve ark. 2004, Fayer 2008, Fayer 2010). Tyzzer'in *Cryptosporidium* türleri ile ilgili ilk yayından tam 48 yıl geçmesine rağmen bu protozoon hakkında başka bir araştırma bulunmamaktadır (Fayer 2008). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda memeli, kanatlı ve reptillerde etkili olan birçok yeni tür tespit edilmiştir. *Cryptosporidium* türlerinin sığır ve kanatlılarda ishale sebep olmalarından dolayı veteriner hekimlik alanında önemleri artmıştır (Sears ve Kirkpatrick 2001). Hayvancılık alanında 1955 yılında 10-14 günlük hindi palazlarında hastalık ve ölüme neden olan *Cryptosporidium meleagridis* yeni bir tür olarak tanımlamıştır. Bu türün hindilerde yaygın olarak ishale, nadir olarak da ölüme sebep olduğu belirtilmiştir (Starling ve Arrowood 1993).

Cryptosporidium türlerinin sığırlarda ishal olguları ile ilişkisi 1970'lerin başlarında gözlenmiştir. Buzağılarda *Cryptosporidium* etkenleri ilk olarak Paancier ve arkadaşları tarafından 1971 yılında kronik zayıflama, dehidrasyon ve ishal görülen bir buzağıda tespit edilmiştir. Araştırıcılar nekropsisi yapılan bu buzağının ince bağırsaklarının histopatolojik muayenesinde villuslarda genel atrofi ve *Cryptosporidium* türlerinin gelişme dönemlerini gördüklerini bildirmişlerdir. Daha sonra Meuten ve arkadaşları tarafından 1974 yılında iki haftalık bir buzağının otopsisinde başlıca ileum ve kolonda lezyonlara rastlandığı ve histopatolojik incelemede *Cryptosporidium* türlerinin çeşitli gelişme dönemlerine rastlandığı bildirilmiştir (Tzipori ve Ward 2002). Türkiye'de ilk defa Burgu tarafından buzağılarda *Cryptosporidium* ookistleri 1984 yılında saptanmış ve *Cryptosporidium* etkeni bildirilmiştir (Burgu 1984).

İnsanlarda *Cryptosporidium* türlerinin ishalle seyreden bir hastalığa sebep olduğu 1976 yılında bildirilmiştir. Kronik ishal görülen üç yaşındaki bir çocukta ve kemoterapi tedavisi sırasında şiddetli ishal görülen bir kanser hastasında *Cryptosporidium* türleri tespit edilmiştir. Şiddetli ishalle beraber bağırsak biyopsilerinin mikroskopik incelemesinde *Cryptosporidium* türleri tespit edildiği bu iki kişinin de köpek ve sığırların bulunduğu çiftliklerde yaşadığı bildirilmiştir. İnsanlarda üçüncü vaka olarak ise dokuz yaşında olan ve konjenital

hipogammaglobulinemia'si bulunan enteritisli bir erkek çocuk rapor edilmiştir. Ancak bu kişinin hayvanlarla beraber yaşayıp yaşamadığı bildirilmemiştir (Fayer 2008). Bu yıllarda bildirilen insan olguları incelendiği zaman *Cryptosporidium* türlerinin bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde fırsatçı parazitler olarak bildirildiği görülmektedir. *Cryptosporidium* türleri özellikle 1980'li yılların başlarında AIDS hastalarının yaşamını tehdit eden bir paraziter enfeksiyon olarak gündeme gelmiş ve 1983 yılına kadar 50 olgu rapor edilmiştir. Ancak daha sonraki çalışmalarda immun sisteminde herhangi bir problem olmayan kişilerde de *Cryptosporidium* türlerinin sıklıkla gastroenteritlere neden olduğu bildirilmiştir (Sears ve Kirkpatrick 2001).

İnsanlar da 1993'de Milwaukee/Wisconsin salgını (yaklaşık 403 000 kişide) ile dikkatler bu protozoon üzerine çekilmiş ve son 20 yıldır dünyada *Cryptosporidium* türlerinin morfolojisi, biyolojisi, bulaşması ve moleküler genetik yapıları ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (Xiao ve ark. 2004, Thompson ve ark. 2005, Fayer 2008, Fayer 2010).

Bugüne kadar *Cryptosporidium* cinsine bağlı 23 adet *Cryptosporidium* türü; balık, sürüngen, kuş ve memelilerde tanımlanmıştır. Memelilerde saptanan 13 *Cryptosporidium* türü *C. hominis*, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. ubiquitum*, *C. muris*, *C. canis*, *C. felis*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. wrairi* ve *C. macropodium* türleridir. Bunlardan *C. andersoni* sığırların abomasumuna, *C. muris* rodentlerin midesine diğer türler ise ince bağırsaklara yerleşmektedirler (Fayer 2010, Fayer ve ark. 2010). Memelilerde bulunan *C. hominis* insanlarda, *C. parvum* ise insan ve çiftlik hayvanlarında bulunmaktadır. Ayrıca *Cryptosporidium baileyi* kuşları, *C. natorum* balıkları, *C. saurophilum* kocarca ve kertenkeleleri, *C. serpentis* sürüngenleri, *C. wrairi* kobayları enfekte etmektedir (Bowman 2009, Fayer 2010, Fayer ve ark. 2010, Xiao 2010).

Sığırlarda *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* ve *C. ryanae* olmak üzere dört tür bildirilmiştir. Bunlardan *C. parvum* türü konak spektrumu en geniş olup, buzağılarda yaygın olarak görülmektedir. *Cryptosporidium parvum*

cryptosporidiosisde ishal olgularından birinci derecede sorumlu türdür. İnsanlarda cryptosporidiosis etiyojisinin % 50 sini *C. hominis* ve % 45' ini ise *C. parvum* oluşturmaktadır. Bu türlere ilaveten *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis* ve *C. suis* insanlarda bulunmuştur (Thompson ve ark. 2005, Nichols 2008, Fayer 2010).

İnsan ve hayvanlarda bulunan ve dünyada yaygın olarak görülen önemli *Cryptosporidium* türleri ve bazı özellikleri Tablo 1.1'de verilmiştir (Fayer ve ark. 2008, Smith 2008).

Tablo 1.1. İnsan ve hayvanlarda bulunan önemli *Cryptosporidium* türleri ve bazı özellikleri

Tür	Başlıca konağı	Yerleştiği Yer	Ookist büyüklüğü	İnsan enfeksiyonu
<i>C. parvum</i>	Çiftlik hayv./ insan	İnce bağırsak	4.5x5.5	Var
<i>C. andersoni</i>	Sığır	Mide	7.4x5.6	Yok
<i>C. bovis</i>	Sığır	İnce bağırsak	4.2-4.8x4.8-5.6	Yok
<i>C. ryanae</i>	Sığır	İnce bağırsak	3.7x3.2	?
<i>C. hominis</i>	İnsan	İnce bağırsak	4.5x5.5	Var
<i>C. suis</i>	Domuz	İnce bağırsak	4.4x5.1	Var
<i>C. felis</i>	Kedi	İnce bağırsak	4.5x5.0	var
<i>C. canis</i>	Köpek	İnce bağırsak	3.7-5.9x3.7-5.9	Var
<i>C. muris</i>	Rodentler	Mide	5.5x7.4	Var
<i>C. wrairi</i>	Kobay	İnce bağırsak	4.0-5.0x4.8-5.6	Yok
<i>C. meleagridis</i>	Hindi	Bağırsak	4.5-5.0x4.6-5.2	Var
<i>C. baileyi</i>	Kümes hayv.	Trakea, bursafabricsius, kloaka	4.6-6.2	Yok
<i>C. gali</i>	Tavuk, ispinoz	Proventrikulus	6.2-6.4x8.0-8.5	Yok

1.3. *Cryptosporidium* Türlerinin Morfolojisi ve Yaşam Döngüsü

Cryptosporidium parvum ve *C. hominis*'in esas yerleşim yeri ince bağırsaklardır. *Cryptosporidium parvum* buzağılarda genellikle ileum üst kısmından sekuma kadar olan bölgede yoğun olarak bulunur. *Cryptosporidium muris*, *C.*

andersoni ve *C. serpentis* türleri gastrik mukozaya yerleşirler. Bazı *Cryptosporidium* türlerine ise ekstraintestinal olarak konjunktiva, solunum sistemi, safra kesesi, lenf nodülleri, testis, ovaryum, uterus ve vajinada rastlanabilmektedir (Thompson ve ark. 2005, Fayer 2010).

Cryptosporidium türlerinin biyolojik gelişmelerinde exogenous safha (konak dışında) ve endogenous safha (konak içinde) olmak üzere ana iki dönemde gelişme görülür. Konak içinde aseksüel çoğalma (merogoni), seksüel çoğalma (gametogoni) ve sporogoni dönemleri görülür Konak dışında ise enfektif ookist formları bulunur (Fayer 2008). Dışkı ile 3,5-7,5 µm (ort:5µm) büyüklüğünde küresel ve 4 adet birbirine paralel çıplak sporozoit içeren milyonlarca ookist atılır. Ookistler atıldığı andan itibaren enfektif olup, fekal-oral bulaşma biçimi ile hastalığın yayılmasında önemli rol oynarlar. Yine ookistler konjunktiva aracılığıyla veya solunum yolu ile de alınabilmektedirler. Ayrıca ince cidarlı ookistler konak içinde parçalandığı için otoenfeksiyonlara da neden olmaktadır (Starling ve Arrowood 1993, Tzipori ve Ward 2002, Xiao ve ark. 2004, O'Handley ve Olson 2006, Taylor ve ark. 2007, Fayer 2008).

Dış ortamda çevre şartlarına oldukça dayanıklı olan ookistlerin dış ve iç cidarı protein, lipit ve karbonhidrattan oluşan bir koruyucu kompleks bariyere sahiptir. Sindirim yolu ile alınan ookistler midede pankreatik enzimler, ince barsakta ise safra tuzları etkisi ile ekskistasyona uğrayarak ookistlerin içinden sporozoitler çıkarlar (Fayer 2008, Wyatt ve ark. 2010, O'Hara ve ark. 2011). Ookistlerin sindirim sisteminde ekskistasyonu için uygun vücut ısısı ve pH (6,8-7,4) 'nın yanı sıra pankreatik tripsin, safra ve mide asitlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Sporozoitler 5,2 x 1,2 µm boyutlarında, hareketli, virgül şeklinde ince bir zarla çevrili yapılardır (Thompson ve ark. 2005). Bu sporozoitler apikal oluşumları ile konak bağırsak hücrelerinin apikal yüzeyindeki hücrelere tutunarak bu hücrelere girerler (Sears ve Kirkpatrick 2001). Parazit önce konak hücre membranı ile temas kurar, roptriler uzayarak sporozoitin konak hücre ile temasını sağlar, daha sonra mikronemler ve yoğun granüller gibi apikal organeller harekete geçer. Parazitin konak hücresi ile temasında sporozoit ya da merozoitlerin sahip olduğu glikoproteinler önemlidir.

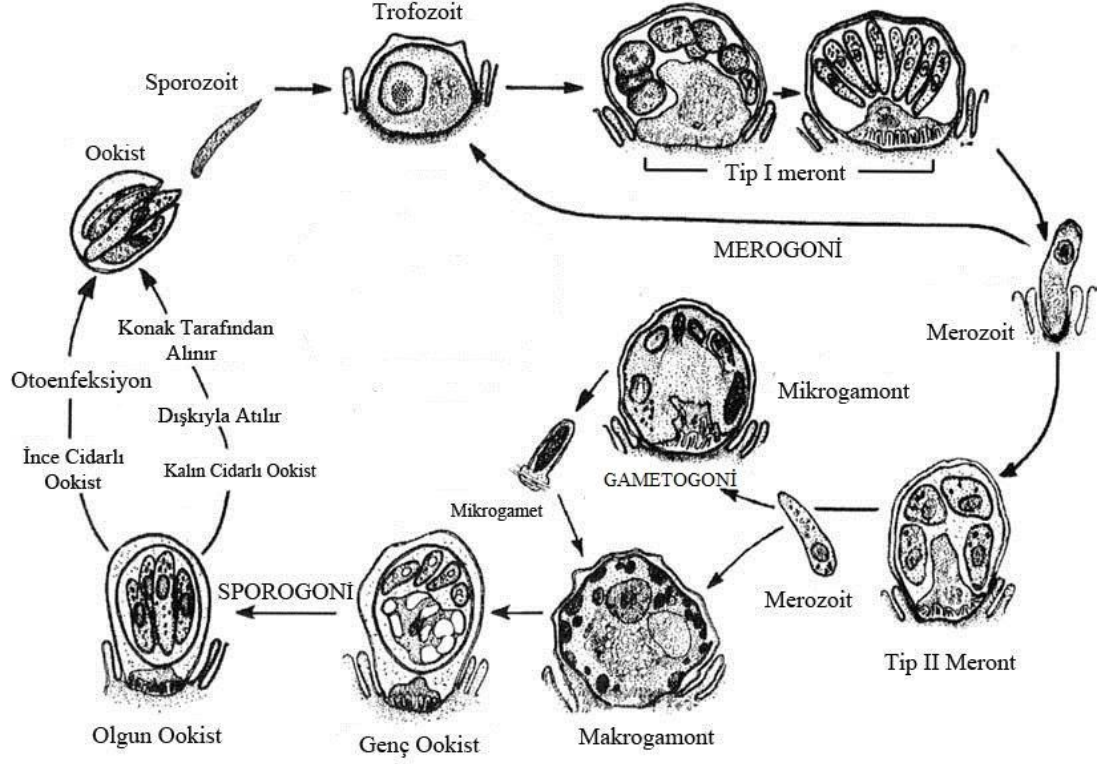
Mucin benzeri bu glikoprotein sayesinde konak hücre ile parazitin teması oluşur ve bir parazitofor vakuol şekillenir. Bu parazitofor vakuol içindeki sporozoitler intrasellüler olup, konak-hücre sitoplazması ile direkt teması yoktur yani ekstrasitoplazmiktir. Parazitofor vakuol içinde parazitler konoid, roptri ve mikronem gibi organelleri ile konak hücre arasında bir bağ oluşturmaktadır. Oluşturulan bu bağ konak hücre ile direkt teması sağlamaktadır (Fayer 2008, Wyatt ve ark. 2010, O'Hara ve ark. 2011).

Sporozoitlerin dokuları istilasında hem konağa hem de parazite ait birçok faktör etkili olmaktadır. Bu faktörler ookist yüzeyinde reseptörlerin eksprese edilmesi, sporozoitlerin kistten çıkması için sinyali verecek olan ookist duvarının tripsine maruz kalması, sporozoitlerin kistten çıkması için parazitlerin gerekli enzimleri (serin proteaz, sistein proteaz, arjinin aminopeptitaz) salgılaması olarak sıralanabilir. Parazitin konak hücreye yapışmasını apikal yüzeyden eksprese edilen sporozoit reseptörleri başlatmaktadır. Parazit ve konak arasındaki tutunmada etkili olduğu düşünülen reseptörler GP900, GP40/15, Trap-C1, P23, Cpa135, CPS-500, CSL, CP12 ve CP2 reseptörleridir (Thompson ve ark. 2005, Borowski ve ark. 2008).

Parazitin konak hücre ile temas kurulduktan sonra oluşan formu trofozoit olarak isimlendirilir. Trofozoitler $2,7 \times 2,7 \mu\text{m}$ çapında oval merkezinde bir çekirdek bulunan yapılardır. Trofozoitler sporozoit ve merozoitler arasındaki bir geçiş aşamasını ifade eder (Thompson ve ark. 2005). Trofozoitlerin çoklu mitotik bölünmesi sonucu parazitin aseksüel çoğalma dönemi yani merogoni (şizogoni) dönemi başlar. Merogoni sonucu tip I merontlar oluşmaktadır. Dünyada yaygın olarak görülen, insan ve hayvanlarda önemli olan *C. parvum*'un merogoni döneminde 2 tip meront (şizont) görülmektedir. *Cryptosporidium baileyi*'de ise 3 tip meront bulunmaktadır. *C. parvum* tip I merontlarında 6-8 adet nukleus şekillenir. Bu tip I merontların çatlaması sonucu 6-8 adet oval veya yarım ay şeklinde, hareketli yaklaşık $1-5 \mu\text{m}$ çapındaki tip I merozoitler serbest kalır (Levine 1985, Thompson ve ark. 2005, Fayer 2008). Merozoitler olgunlaşınca enfekte ettiği konak hücrelerini parçalayarak terk eder ve yeni hücreleri enfekte ederler. Bu yeni hücrelerde yine aseksüel çoğalma dönemi yani ikinci merogoni ile çoğalarak tip I merontları ya da

bazılarında Tip II merontları oluştururlar. Tip I merontlardan oluşan tip I merozoitler konakta yeni hücreleri enfekte ederek tekrar merogoni başlatırlar. Tip II merontlar ise 4 adet merozoit içerirler ve eşeysiz üreme ile çoğalarak 2-3,5 µm sivri şekilli veya 1,5-1,6 µm pleomorfik şekilli tip II merozoitleri oluştururlar. (Levine 1985, Sears ve Kirkpatrick 2001, Fayer 2008). Tip II merontlardan oluşan merozoitler seksüel üremeyi başlatırlar ve farklı konak hücrelerine girerek mikrogamont (erkek, mikrogametosit) ve makrogamont'ları (dişi) oluştururlar. Mikrogamontların büyüklükleri 4-5 µm olup, dairesel şekildedirler ve olgunlaşmamış dönemde çok sayıda yoğunlaşmış çekirdek kısımları, ribozomlar, endoplazmik retikulum ve membrana bağlı vakuoller içerirler. Olgunlaştıktan sonra mikrogamontların içinde 14-16 adet 1,6-2,2 µm çapında kurşun şeklinde, hareketli sperm hücresiyle eşit olan mikrogametler gelişir. Makrogamontların ise genç formları trofozoitlere benzer büyük bir çekirdek ve endoplazmik retikulum içerirler. İki katlı membranla çevrili olan makrogamontların olgun formları 3,2-5 µm çapındadır ve ovum ile eş değerlidir. Makrogametler ise 4-6 µm büyüklüğündedir (Sreter ve Varga 2000, Fayer 2008). Mikrogametlerin makrogamontları nasıl buldukları (ya da fark ettikleri) bilinmemekle beraber, mikrogametlerin konak hücre membranına tutunması ve penetre olması ile makrogamont hücre membranı fertilizasyonu oluşmaktadır. Daha sonra ise mikrogametler makrogamont sitoplazmasına girer ve onu dölleyerek makrogamonttan ookist gelişir (Fayer 2008). Tip II merozoitlerden zigota kadar olan dönem eşeyli üreme şekli olan gametogoni'dir (Sarıkaya 2004, Huang ve ark. 2004). Bu dönemde makrogamont etrafında üç katlı cidar şekillenir, 2n kromozumlu döllenen makrogamontlar mayoz bölünme geçirir ve 4 adet 1n yapılı sprozoitler gelişir (Fayer 2008).

Cryptosporidium parvum 'un şematize edilerek hazırlanan biyolojik gelişmesi Şekil 1.1' de verilmiştir (Fayer 2008).



Şekil 1.1. *Cryptosporidium parvum* 'un biyolojik gelişmesi (Fayer 2008).

Ookistler sporogoni ile sporlanıp olgunlaştıklarında içlerinde 4 adet çıplak sporozoit şekillenir ve konak gastrointestinal sisteminde sporlanan bu ookistler dışkı ile dışarı atılırlar. Solunum sisteminde yerleşen türlerde ise ookistler solunum ve burun akıntıları ile dışarı atılır (Fayer 2008). *Cryptosporidium* türlerinde iki tip ookist şekillenir. Bunlardan kalın cidarlı olanlar (yaklaşık % 80 kadar olup) vücut dışına atılarak, duyarlı konakçılarda enfeksiyona sebep olurken ince cidarlı ookistler ise (yaklaşık % 20 kadarı) konak içinde açılarak otoenfeksiyonlara sebep olurlar (Dubey ve ark. 1990, Thompson ve ark. 2005).

Cryptosporidium türlerinde prepatent süre çeşitli hayvan türlerinde 2-9 gün arasında gözlenirken patent sürenin ise birkaç günden birkaç haftaya kadar

değişebildiği gözlenmiştir (Tüzer ve Toparlak 1999, Fahey 2003, Thompson ve ark. 2005).

Enfektif ookistlerin alınmasından parazitin endogen gelişmesini tamamladığı yani ookistlerin ilk olarak oluştuğu ve dışkı ile atıldığı süreye kadar geçen zaman olarak tanımlanan prepatent süre alınan enfektif ookist dozuna ve konağa göre değişmektedir. Bu süre buzağılardaki enfeksiyonlarda 2-7 gün, insanlarda 4-22 gündür. Ookist atılımının devam ettiği döneme ise patent dönem adı verilir ve bu süre *C. parvum*'la enfekte buzağılarda 1-12 gün, insanlarda 1-20 gündür (Fayer 2008). Bazı *Cryptosporidium* enfeksiyonlarında prepatent ve patent süreler Tablo 1.2' de verilmiştir (Fayer 2008).

Tablo 1.2. *Cryptosporidium* türlerinde prepatent ve patent süreler

Tür	Konak	Prepatent süre (gün)	Patent Süre (gün)
<i>C. parvum</i>	Buzağı	2-7	1-12
	İnsan	4-22	1-20
<i>C. bovis</i>	Sığır	10-12	18
<i>C. ryanae</i>	Buzağı	11	15-17
<i>C. suis</i>	Domuz	2-9	9-15
<i>C. felis</i>	Kedi	5-6	7-10
<i>C. muris</i>	Fare	6-21	30-90
<i>C. baileyi</i>	Tavuk	4-24	18

1.4. *Cryptosporidium* Türlerinin Moleküler Yapısı

Cryptosporidium türlerinde kromozom büyüklüğü 0,9-1,4 Mb arasında değişen sekiz kromozom bulunmaktadır. Kromozom üzerinde bulunan gen sayıları türlerde farklılıklar göstermektedir. Örneğin; *Cryptosporidium hominis*'te 3994, *C. parvum*'da 3952 gen olduğu düşünülmektedir. Gen sayılarının değişmesi ayrıca genom uzunluğunu da etkilemektedir. Genom uzunlukları karşılaştırıldığında *C. parvum*'un 9,11 Mb, *C. hominis*'in 9,16 Mb uzunluğa sahip olduğu belirtilmiştir. (Thompson ve ark. 2005, Üner ve ark. 2007, Kissinger 2008). Genlerin % 5-20'sinde intron yoktur. (Abrahamsen ve ark. 2004, Xu ve ark. 2004). Genom uzunluğundaki

değişikliklere rağmen *Cryptosporidium parvum* ve *C. hominis* genomlarının % 97 oranında aynı olduğu görülmektedir. *Cryptosporidium parvum* ve *C. hominis* türleri arasındaki fenotipik farklılıkların genler arasındaki çok küçük değişikliklerden kaynaklandığı varsayılmaktadır. *Cryptosporidium* türleri içinde genomuna ait dizisi elde edilmiş iki tür mevcuttur. Bunlardan ilki *C. hominis* ikincisi ise *C. parvum*'dur (Abrahamsen ve ark. 2004, Xu ve ark. 2004, Üner ve ark. 2007).

Cryptosporidium hominis'in (Ia, Ib, Id, Ie, If, Ig) altı, *C. parvum*'un (IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIf, IIg, IIh, Iii, IIk, III) 11 subtip familyası tespit edilmiştir (Xiao 2010). *Cryptosporidium parvum*'un bu subtip familyalarından IIa, IIb ve IId zoonotik olup çok sayıda subgenotipleri bulunmuştur. *Cryptosporidium parvum* IIa subtip familyasının 45 subgenotipi tanımlanmış olup, bunlardan 18'i hem insan hem de sığırlarda bulunmaktadır. *Cryptosporidium parvum* IId'nin ise 13 subgenotipi vardır ve bunlardan 6'sı insan ve sığırlarda görülmektedir. İnsan ve hayvanlarda en çok görülen zoonotik tip *C. parvum* IIa subtip familyasıdır. Dünyada en yaygın olarak görülen zoonotik subtipler ise IIaA15G2R1 ve IIaA18G3R1'dir. *Cryptosporidium* türlerinin GP-60 gen sekans analizi sonucu yüksek derecede genetik polimorfizim gösterdiği ve bu nedenle çok sayıda genotiplerinin belirlendiği kaydedilmiştir (Thompson ve ark. 2007, Plutzer 2009, Xiao 2010). Dünyada 61 *Cryptosporidium* subgenotipi rapor edilmiştir. Bunlardan 24 subgenotip insanlara bulaşmaktadır.

Konak spektrumu geniş olan ve sığırlarda da yaygın olarak bulunan *C. parvum* türünün GP60 lokusundaki subgenotipleri Tablo 1.3’de görülmektedir (Nichols 2008).

Tablo 1.3. *Cryptosporidium parvum*’ un subgenotipler

Subtip familyası	Konak/Ookist kaynağı	Subgenotipi
<i>C. parvum</i> IIa	Buzağı, insan (zoonotik)	IIaA15G2R1, IIaA15G2R2, IIaA16G1R1 (45 subgenotipi, 16’sı sığır ve insanlarda)
<i>C. parvum</i> IIb	İnsan, buzağı, koyun (zoonotik)	IIbA14
<i>C. parvum</i> IIc	İnsan (antroponotik)	IIcA5G3a, IIcA5G3b, IIcA5G3d,
<i>C. parvum</i> IId	İnsan, buzağı (zoonotik)	IIdA18G1 (13 subgenotipi; 6’sı sığır ve insanlarda)
<i>C. parvum</i> IIE	Antroponotik	IIeA12G1
<i>C. parvum</i> IIf		IIfA6
<i>C. parvum</i> IIg		IIgA9
<i>C. parvum</i> IIh		IIhA7G4
<i>C. parvum</i> IIi <i>C. parvum</i> IIk <i>C. parvum</i> III		IIiA10

Dünyada yaygın olarak bulunan türlerden olan ve insanların *Cryptosporidium* enfeksiyonlarında etiyolojik olarak birinci derecede rol oynayan *C. hominis* türünün GP60 lokusundaki subgenotipleri Tablo 1.4’de sunulmuştur (Nichols 2008).

Tablo 1.4. *Cryptosporidium hominis*’ in subgenotipleri

Subtip familyası	Konak/Ookist kaynağı	Subgenotip
<i>C. hominis</i> Ia	İnsan	IaA23R4
<i>C. hominis</i> Ib	İnsan	IbA10G2, IbA9G3
<i>C. hominis</i> Id	İnsan	IdA16
<i>C. hominis</i> Ie	İnsan	IeA11G3T3
<i>C. hominis</i> If	İnsan	IfA19G1
<i>C. hominis</i> Ig	İnsan	IgA24

Belirli genler ve proteinler evrimsel kronometreler olarak kullanılır, evrimsel değişimi ölçerler. Diğer bir değişle işlevsel olarak benzer (homolog) makro moleküllerin nükleotid ve amino asit dizisindeki farklılıklar, evrimsel uzaklıkların sonucudur. Bu moleküllerin hepsi, ilkel hücrelerde bile gereklidir ve bu sebeple onların gen dizilerindeki varyasyonlar, evrimsel geçmişlerinin daha derinlemesine incelenmesine olanak sağlarlar. Bu kronometreler arasında en yaygın olanı ribozomal RNA’lardır. Ribozomal RNA’lar, oldukça büyük, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın moleküller olup, tüm hücrelerde nükleotid dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içerirler. Prokaryotlarda büyüklükleri 5S, 16S ve 23S olan üç çeşit ribozomal RNA molekülü vardır. Eukaryotlarda ise dizileme çalışmaları, işlevsel olarak benzer fakat biraz daha büyük 18S molekülü üzerinde odaklanmıştır. 16S ve 18S rRNA’ları ribozomun küçük alt biriminin (30S veya 40S) bir parçası olduklarından, SSU (küçük alt birim) dizilemesi kısaltması, 16S veya 18S dizilemesi ile eş anlama gelmektedir. Ribozomal RNA dizilerinin elde edilmesi ve filogenetik

ağaçların oluşturulması, moleküler biyoloji ve bilgisayar analizlerinin beraber yürütülmesi sonucu şu an oldukça rutin hale gelmiştir (Madigan ve ark. 1997).

Apicomplexa grubu parazitlere benzer olarak *Cryptosporidium* türlerinde 4-5 adet tRNA, 6 adet 5SrRNA ve 5 adet 5.8S ile 18S ve 28S RNA genleri bulunmaktadır (Üner ve ark. 2007). Mitokondri ve plastid gibi diğer Apicomplexa gurubu parazitlerde ve bazı *Cryptosporidium* türlerinde bulunan organeller *C. parvum*'da bulunmamaktadır (Fayer 2008).

1.5. Klinik Belirtiler

Cryptosporidium parvum neonatal ruminantlarda ileum ve kalın barsak proksimal kısmına yerleşerek intestinal cryptosporidiosis ve neonatal diyareye neden olmaktadır. *Cryptosporidium parvum* daha çok üç aylıktan küçük ya da süttan kesim öncesi buzağılarda görüldüğü halde *C. andersoni*, *C. bovis* ve *C. ryanae* türlerine süttan kesim sonrası ya da üç aylıktan ileri yaşlarda rastlanmaktadır. Bu nedenle neonatal cryptosporidiosis vakalarında *C. parvum* türü birinci derece sorumlu ajan olarak tanımlanmaktadır (Kvac ve ark. 2006, O'Handley ve Olson 2006, Feng ve ark. 2007, Fayer 2008).

Neonatal ruminantlarda *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonlarında en önemli klinik belirti ishaldir. İshal genellikle tipik soluk sarımsı renkli, bol sulu, bazen mukuslu olabilir. Genel halsizlik, iştahsızlık, hayvanın arka tarafının dışkı ile bulaşık olması, kılların canlılığını yitirmesi, matlaşması ve dehidrasyon ishale eşlik eden diğer önemli belirtilerdir. Klinik belirtiler ookistler alındıktan 3-5 gün sonra belirgin olarak ortaya çıkar ve 4 ile 18 gün kadar devam edebilir (O'Handley ve ark. 2006). Nadirde olsa şiddetli cryptosporidiosis olgularında aşırı dehidrasyon, metabolik asidosis, beden ısısında hafif artış (maksimum 40,1°C) ve ölüm görülmektedir. Cryptosporidiosis yüksek morbidite ve düşük mortalite ile seyreden bir enfeksiyondur. Hayvanların çoğunda tedavi olmaksızın kendiliğinden iyileşme görülür. Ancak iyileşmenin şekillenmesinden kısa bir süre sonra ishal yeniden ortaya çıkabilir. Bu parazit protozoonun diğer enteropatojenlerle (*Escherichia coli* ve

Proteus grubu bakteriler ile *Rota* ve *Corona* viruslar) birlikte ortaya çıktığı enfeksiyonlarda klinik bulguların daha şiddetli ve ölümün daha fazla olduğu saptanmıştır. Buzağı ishallerinde *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Clostridium* sp., rotavirus, coronavirus, parvovirus, *Eimeria* sp. gibi bir çok enteropatojenler etkili olmaktadır (Thompson ve ark. 2005, O’Handley ve ark. 2006).

Buzağılar *Cryptosporidium* türleri ile genellikle 1-4 haftalık yaşlarda enfekte olurlar. Enfeksiyon 2 hafta kadar devam etmektedir. Ookist atılımı en erken 2 günlük iken başlar ve 2 haftalık yaşlarda en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Ookist atılımı 10 gün kadar sürmektedir (Olson ve ark. 2004). Cryptosporidiosisin şiddetli seyretmesinde alınan ookist sayısı, sürü bağışıklığı, diğer enfeksiyonların varlığı, besleme ve çiftlik yönetimi-idaresi etkili faktörlerdir. İyi bir çiftlik yönetimi *C. parvum* enfeksiyonlarının ciddi sorunlar oluşturmasını engelleyebileceği gibi cryptosporidiosisin daha hafif geçmesini sağlamaktadır (O’Handley ve ark. 2006).

Klinik cryptosporidiosis olgularında hayvanların ırkı da önemlidir. Etçi ırklarda cryptosporidiosis salgınlarına sütçü ırklardan daha az rastlanmaktadır. Ancak etçi buzağılarda enfeksiyon daha şiddetli olup mortalite oranı daha yüksektir. Sütçü buzağılarda doğum sezonunda buzağuların sürüye girmesini takiben enfeksiyon oranı artmaktadır. Neonatal ishal olgularında çoğunlukla *Cryptosporidium* türleri ve diğer enteropatojenler birlikte görülmektedir. Ayrıca klinik belirtilerin görülmediği hayvanlarda (buzağı gibi) *Cryptosporidium* ookistleri saptanabilmektedir (O’Handley ve ark. 2006). Irmak (1991), yeni doğan buzağılarda deneysel olarak oluşturduğu *Cryptosporidium* enfeksiyonunda klinik olarak enfeksiyonun 4. gününde sulu kıvamda, açık sarıdan koyu sarıya değişen renkte, pis kokulu yer yer mukus ve fibrin, bazen de gaz kabarcığı içeren ishal tespit etmiştir. İshalin şiddetiyle beraber buzağılarda anoreksi, dehidrasyon, deri elastikiyetinde azalma, gözlerin göz çukuruna çekilmesi, kılların parlaklığını kaybetmesi gibi bulgularda gözlemlenmiştir.

Abomazum cryptosporidiosisine neden olan *C. andersoni* türünün tüm dünyada süttten kesilmiş et ve süt sığırlarında bulunduğu bildirilmiştir. Enfeksiyon, belirgin bir klinik belirti göstermeden aylar hatta yıllar boyunca devam edebilir. *C.*

andersoni enfeksiyonlarına yakalanmış sığırlarda ishal görülmemektedir. Sığırlarda orta veya aşırı derecede kilo kaybı görülmektedir. Enfeksiyon görülen sığırlar, yüksek proteinli gıdalarla beslenmesine rağmen, düşük gastrik pH nedeniyle proteinleri yeterince sindirememektedirler. Bu sebeple *C. andersoni* et ve süt işletmelerinde önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Thompson ve ark. 2005, Zajac ve Conboy 2012).

Koyun ve keçilerde bağırsak cryptosporidiosisine *C. parvum* ve yeni bir *C. parvum* genotipi sebep olmaktadır (Thompson ve ark. 2005). Neonatal kuzularda görülen en önemli klinik bulgu orta veya ağır derecede çok sayıda ookist içeren ishaldir. Ayrıca depresyon, anoreksi, kas ağrıları ve süt emmede azalma görülür (De-Graaf 1999, Ramirez ve ark. 2004, Thompson ve ark. 2005). İshal tipik sarı renkte olup ağır bir kokuya sahiptir. Kuzularda prepatent periyot 2-7 gün arasındadır. Oğlaklarda ise 4 gün civarındadır. Bu süre alınan ookist sayısının az olması ve hayvanın yaşının artması ile uzamaktadır. Hastalığın hafif seyrettiği hayvanlarda ishal 3-5 gün, daha ağır seyrettiği hayvanlarda ise 1-2 hafta arasında devam eder. Ookist atılımının süresi hayvanın yaşı, immun durumu gibi faktörlere bağlı olarak değişebilir. Deneysel çalışmalarda ve doğal enfeksiyonlarda ookist atılımının kinetiği çoğu kez aynıdır. İlk 2-3 günden sonra ookist atılımı artarak 5-6. günde maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Sığırlarda olduğu gibi enfeksiyona viruslar (Rota virus), bakteriler (*E.coli*, *Clostridium perfringes*, *Salmonella*) ve parazitler (*Giardia*, *Eimeria*) eşlik ettiği takdirde tablo daha da ağırlaşmaktadır (De-Graaf 1999, Thompson ve ark. 2005).

Cryptosporidiosis insanlarda hem immünsüprese hem de immunokompetent bireylerde gastrointestinal sisteme ilişkin klinik bulgular oluşturmaktadır. Klinik belirtilerin şiddeti ve süresi hastaların yaşı ve bağışıklık durumuna göre değişmektedir. İshal immunokompetent bireylerde iki haftada kendi kendini sınırlayan tarzda iken, immünsüprese bireylerde bir günde 20 litreye varabilen kolera benzeri tarzda olup yaşamı tehdit etmektedir. Kilo kaybıyla karakterize olan ishal sulu nitelikte olup mukus içerebilir. Ancak kan ve lökosit görülmemektedir (Fındık 1994, Dirim ve ark. 2003, Thompson ve ark. 2005). Diğer semptomlar ise karın

ağrısı, bulantı, kusma, düşük dereceli ateş (<39 °C), myalji, halsizlik, baş ağrısı ve anoreksidir. Sindirim kanalı dışında solunum sistemi, akciğerler, karaciğer, safra yolları, pankreas etkilenen diğer organlar arasında yer almaktadır (Laurent 1999, Ramirez ve ark. 2004, Terzi 2005, Thompson ve ark. 2005). Ookistlerin alınmasından klinik olarak görülmesine kadar geçen süre 2-14 gün arasında değişmektedir (Thompson ve ark. 2005). Yine AIDS dışındaki diğer immunsüprese hastalarda hastalığın süresi ve ciddiyeti immun supresyonun şiddetine bağlı olarak değişmektedir. Bu bireylerde tedavi amaçlı kullanılan sitotoksinlerin immun sistemi baskılama derecesine göre hastalık asemptomatik taşıyıcılık, orta şiddette veya ciddi ishal şeklinde görülmektedir (Yetkin 1998).

1.6. Patogenez

Cryptosporidium enfeksiyonlarının patogenezini parazitlerin epitel hücrelerin mikrovilluslarının fırçamsı kenarlarına tutunarak bağırsak mukozasının fonksiyonlarını bozmasıyla başlamaktadır (Gül ve Özdemir 1990, İmren ve Şahal 1996). *Cryptosporidium parvum* türleri esas olarak ince bağırsak distal kısmına (ileum) yerleşmekle beraber, ince bağırsak proksimal kısımları (jejunum, duodenum) ile sekum ve kolonda da görülebilirler (Tzipori ve Ward 2002, O'Handley ve Olson 2006, Fayer 2008, Santin ve Trout 2008, Wyatt ve ark. 2010). Bağırsak epitel hücreleri; kalın ve ince cidarlı ookistlerden eksiste olan sporozoitler ve sporogoni sonucu oluşan merozoitler tarafından istila edilir (Clark 1999, Fahey 2003). Bunun sonucu hızlı bir epitel hücre ölümü ve mukoza zedelenmesi başlar. Yıkılan epitel hücrelerin yenilenebilmesi için kript hücre hiperplazisi ve lamina propriada yangı hücre infiltrasyonu uyarılmaktadır. Kript hücre hiperplazisi ve lamina propriadaki hücre artışı PGE₂ ve Cl⁻ sekresyonunu artırarak ishale sebep olmaktadır (Clark 1999). İnfeksiyon sonucunda patolojik olarak villus atrofi, villuslarda birleşme, kript hiperplazisi, mikrovilluslarda bozulma, yangısal hücre infiltrasyonu şekillenmektedir. Tüm bu değişiklikler barsak yüzey kısımlarında hasara, beslenme bozukluğuna, enzim kayıplarına ve elektrolit transportunda bozulmalara sonuç olarak da malabsorpsiyona neden olmaktadır. Ayrıca parazitlerin salgıları ve kolera benzeri toksinlerinin bulunması salgısal tip diyarenin gelişmesine neden olmaktadır. Son

yıllarda yapılan araştırmalar *Cryptosporidium* türlerinin apoptosise neden olabileceğini iddia etmektedir. Yine bağırsak epitellerinin birleşme yerlerinde yıkımlanmaya, bağırsak bariyer fonksiyonlarında kayba yol açabileceği de iddia edilmektedir (Tzipori ve Ward 2002, O’Handley ve Olson 2006, Fayer 2008, Santin ve Trout 2008, Wyatt ve ark. 2010). Bu patolojik olayların sonucunda *Cryptosporidium* türleri ile enfekte konaklarda malabsorpsiyon (kötü emilim, barsakta emilimin iyi olmaması) ve sıvı sekresyonunda artış meydana gelmektedir. Sıvı sekresyonundaki artış mukozal bariyerin bozulmasıyla makro moleküllerde permeabilite artması ve bağırsak epitel hücreleri içinde bulunan iyonların ve suyun tekrar bağırsak lümenine atılmasıyla oluştuğu bildirilmektedir (Levine 1985, Tüzer ve Toprak 1999, Thompson ve ark. 2005).

Cryptosporidium andersoni türünün neden olduğu abomazumdaki klinik belirtiler belirgin olmadığı gibi, patolojik lezyonlarda sınırlıdır. Bu tip cryptosporidiosisde peptik ve pilorik bezler etkilenir ve bunun sonucunda ise gastrik mukozada hipertrofi, gastrik bezlerde dilatasyon ve epitel hücrelerde atrofi şekillenebilir. Enfeksiyon sırasında yapılan mikroskopik muayenelerde abomazum bez epitel hücrelerine tutunmuş çok sayıda çeşitli evrelerdeki etkenler görülmektedir (Thompson ve ark. 2005, O’Handley ve ark. 2006).

Otopside bağırsaklarda gazlı bir şişlik, bağırsak lümeninde kan veya mukoid sıvı, açık sarı sulu içerik, intestinal mukozada konjesyon, mezenteriyel lenf yumrularında ödem ve büyüme görülmektedir. Ancak bu bulgular tanı için yeterli değildir. Buzağların otopsisinde ince bağırsak mukozasındaki değişikliklerin ileumda çok şiddetli olduğu tespit edilmiştir. Bu bölgelerde hiperemi özellikle ileumun bazı bölgelerinde şişlik ve hastalığın klinik şiddetine göre değişen oranda mukoza kalınlığında azalma görülmektedir. Yine bağırsak villuslarında çeşitli derecede erime, ödem, yapışma, atrofi şekillenmektedir (Gül ve Özdemir 1990, Thompson ve ark. 2005).

1.7. İmmunite

Sığırlarda intestinal protozoon enfeksiyonlarında yaş önemli bir faktördür. Bu bağırsak parazitlerinden olan *Cryptosporidium* enfeksiyonlarında da gençler daha duyarlıdır. Özellikle yeni doğan hayvanların bağırsak mikroflorası ve immün sistemi tam gelişmediği için bunlarda hastalık daha şiddetli seyretmektedir (Sears ve Kirkpatrick 2001).

Cryptosporidium enfeksiyonlarında hem hücresel hemde humoral immün yanıt oluşmaktadır. Oluşan ilk immün yanıt T-lenfositlerinin artışıdır. Ayrıca CD4⁺ T hücreleri ve interlökin-12 ve interferon IFN- γ gibi bazı stokinlerin bağırsakta artışı görülmektedir (Sears ve Kirkpatrick 2001, Huang ve ark. 2004, Thompson ve ark. 2005). Bu enfeksiyonda spesifik antikorların şekillendiği IgA'nın sporozoit ve merozoitlerin bağırsak mikrovilluslarına tutunmasını engellediği tespit edilmiştir. *Cryptosporidium* türleri ile enfekte bireylerde önce IgM daha sonra IgG yanıt oluşmaktadır. IgG düzeyi birkaç ay içerisinde azalmakla birlikte yıllarca serumda pozitifliğini devam ettirmektedir. Enfeksiyon sırasında daha sonra IgA ve IgG miktarında artış görülmektedir (Thompson ve ark. 2005).

Cryptosporidiosis insanlarda hem immünkompetent hemde immünsüpre konaklarda görülen önemli bir hastalıktır. İmmünkompetent insan ve hayvanlarda belirli dokuları (genellikle bağırsaklar) etkileyerek kendi kendini sınırlayan tarzda enfeksiyon gelişmektedir. AIDS hastaları gibi immünsüpre konaklarda diğer dokulara da yayılarak ciddi klinik belirtiler gösterir ve nükseden kronik enfeksiyonlara sebep olmaktadır (De-Graaf 1999). Humoral immuniteleri sağlam olan AIDS hastalarında hastalığın gelişimi açıklanamadığı için hücresel immunitenin *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının gelişiminde daha etkili olduğu belirtilmiştir (Yetkin 1998).

1.8. Epidemiyoloji

Cryptosporidium enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde etken, konak ve çevre önemli rol oynamaktadır. Etken olan *Cryptosporidium* türü, konak çeşidi, konağın yaşı, çevre iklimsel özellikleri, konakların bulunduğu ahır ve ortamın koşulları ile çiftlik yönetimi cryptosporidiosis epidemiyolojisinde genel olarak rol alan faktörlerdir. Sığırlarda *C. parvum*'un prepatent süresi 2–7 gün olup, enfekte hayvanlar dışkıları ile 2-3 hafta kadar (ortalama 10 gün) ookist çıkarırlar. Konaktan dışarı atılan ookistler enfektiftir. Genç ve ishalleri olan buzağular gram dışkıda 10^7 den daha fazla ookist atarlar. Enfeksiyonun oluşması için 30 ookist yeterli olmaktadır (Fayer 2008, Wyatt ve ark. 2010, O'Hara ve Chen 2011).

Neonatal buzağular doğduktan 2 gün sonra ookistleri atmaya başlamaktadırlar. Ancak en yüksek ookist atılımı yaklaşık 14 gün sonra meydana gelmektedir (O'Handley ve ark. 1999, Becher ve ark 2004, Fayer 2008). Dışkı ile dışarı atılan kalın cidarlı enfektif bu ookistler su, gıda ya da yakın temasla oral yolla alınarak konakların enfekte olmasına neden olmaktadır. Buzağularda yaygın olarak görülen *C. parvum* türünde genellikle su kaynaklı bulaşım söz konusudur. Buzağuların dışkıları ile kirlenen suların içilmesi ile hayvanlara ve zoonotik olarak insanlara enfeksiyon bulaşmaktadır. Yani *C. parvum* 'un sığırlarda bulunan subtipleri (zoonotik olanlar) genellikle su ile insanlarda bulunan (antroponotik türü) subtipleri ile *C. hominis* türü ise gıda ve su ile bulaşmaktadır (Fayer 2008).

Cryptosporidium ookistlerinin bulaşım kaynakları ve bulaşma yolları ile ilgili ayrıntılı bilgi Şekil 1.2' de verilmiştir (Fayer 2008).



Şekil 1.2. *Cryptosporidium* ookistlerinin bulaşım kaynakları (Fayer 2008).

Buzağılarda enfeksiyon ortalama iki hafta kadar devam etmektedir. Ookist atılımı ise bir veya dört hafta sürmektedir (Fayer ve ark. 1998, O’Handley ve ark. 1999, de Graaf 1999). Bu süre boyunca enfekte buzağuların dışkılarıyla atıkları ookistler diğer buzağular için önemli bir risk faktörü oluşturmaktadırlar.

*Cryptosporidiosis*in bulaşmasında ve salgın hale gelmesinde genç hayvanların önemli bir yeri vardır. Çünkü gençler dışkıları ile daha fazla ookist atarlar. Buzağılarda gram dışkıdaki ookist atılımı yaklaşık 6×10^7 düzeylerinde olup, bu sayı 6×10^{11} leri bulmaktadır (Uga ve ark. 2000). *Cryptosporidium* enfeksiyonları gençlerde ishale neden olmaktadır. Bu nedenle ishali buzağılarda ookist atılımının ve ookist yoğunluğunun yüksek olduğu belirtilmiştir (Singh ve ark. 2006). Ayrıca 2 aylık öncesi (süt kesim öncesi) yaşlardaki buzağılarda ve sütçü işletmelerde,

zoonotik olan *C. parvum* türü daha yaygındır. Bu sebeple buzağular *C. parvum*' u insanlara daha fazla bulaştırmaktadırlar (Geurden ve ark. 2006, Kvac ve ark. 2006, Thompson ve ark. 2007, Keshavarz ve ark. 2009).

Cryptosporidium parvum neonatal ruminantlarda ileum ve kalın bağırsağın proksimal kısmına yerleşerek intestinal cryptosporidiosis ve neonatal diyareye neden olmaktadır. *Cryptosporidium parvum* daha çok üç aylıktan küçük ya da süttten kesim öncesi buzağularda görüldüğü halde *C. andersoni*, *C. bovis* ve *C. ryanae* türlerine süttten kesim sonrası ya da üç aylıktan ileri yaşlarda rastlanmaktadır. Bu nedenle neonatal cryptosporidiosis vakalarında *C. parvum* türü birinci derece sorumlu tür olarak tanımlanmaktadır (Kvac ve ark. 2006, O'Handley ve Olson 2006, Feng ve ark.2007, Fayer 2008).

Ookistlerin çevre şartlarına dirençli olması, fekal-oral bulaşmanın yaygın olarak görülmesi, su ile bulaşımın salgınlara dönüşmesi, işletmedeki buzağuların anneleri ile bir arada olması, sığır ve buzağı sayısının fazla olması, kalabalık yetiştirmeler, sürü büyüklüğü, gibi faktörler *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının yaygınlığında rol oynamaktadır. Neonatal rumimantlarda *C. parvum* enfeksiyonları etçi buzağulara göre süttü buzağularda daha yaygın olarak görülmektedir. Bunda süttü işletmelerdeki buzağı sayısının fazla olması ve bu buzağularında dışkı ile fazla ookist çıkarması etkili olmaktadır. Yine yetiştirme tipi (kapalı veya yarı açık), iklim, havanların merada olup olmaması, yaşlılarla bir arada bulunma, altlık durumu, su içme düzeni, altlık temizlenme biçimi ve sıklığı, hayvan sayısı, farklı yaş gruplarındaki hayvanların aynı bölmelerde bulunması gibi çeşitli faktörler cryptosporidiosisin yayılışında etkili faktörler olarak sayılabilir.

Sığırlarda cryptosporidiosis epidemiyolojisinde etkili olan risk faktörleri Tablo 1.5’ de maddeler halinde sunulmuştur (Thompson ve ark. 2005, O’Handley ve Olson 2006, Starkey ve ark. 2006, Nichols 2008, Silverlas ve ark. 2009).

Tablo 1.5. Sığırlarda cryptosporidiosis epidemiyolojisinde etkili risk faktörleri

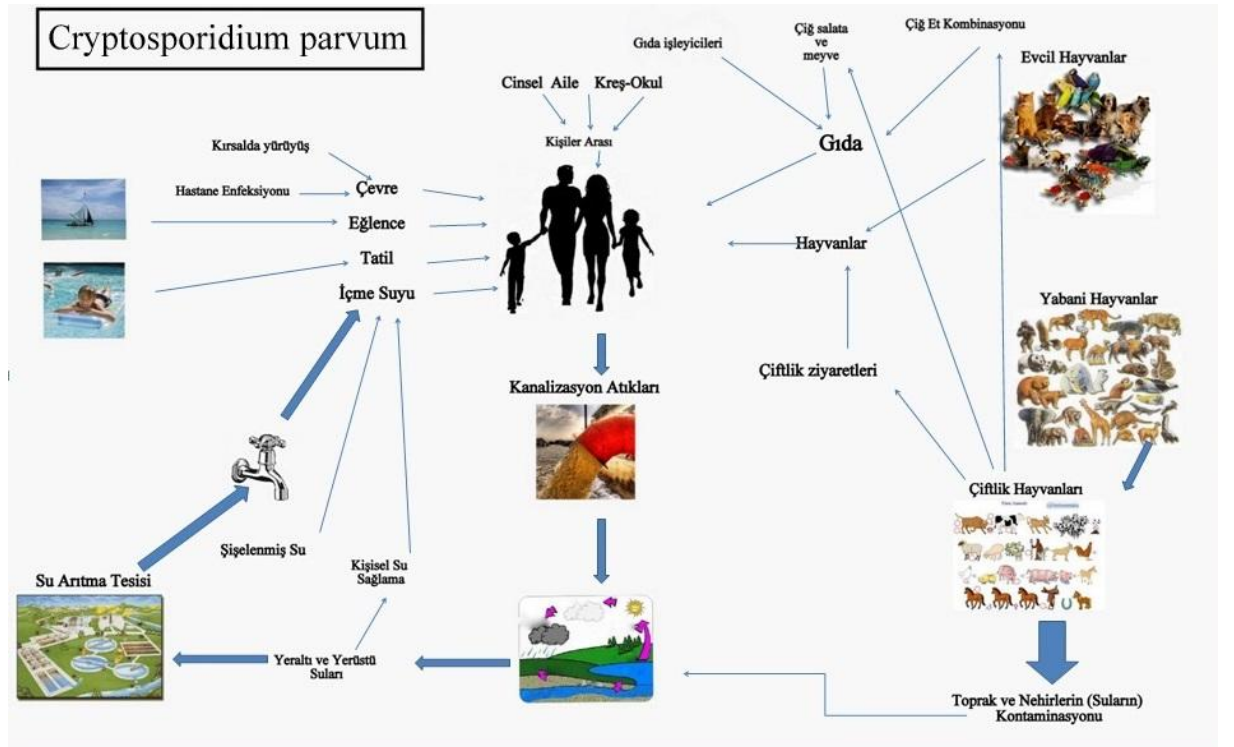
➤ Çiftlikteki hayvan sayısı (sürü büyüklüğü)	➤ Ergin sığırlardaki subkilinik vakalar
➤ Buzağı ve yaşlı hayvanların aynı ahırda bulunup, bulunmaması	➤ Ahırda köpek-kedi-fare-artropod varlığı
➤ Çiftlik/ahırdaki hayvanların yaş dağılımı	➤ Yemlik-samanlık dışkı ile bulaşma
➤ Beslenme tipi	➤ Ahır ile yemlik-samanlık irtibatı
➤ İçme suyu biçimi/şekli (ahır içinde, ahır dışında)	➤ Merada su içme şekli
➤ Toplu olarak dere, çay, göl, gölet gibi sulardan içilmesi	➤ Ahırın hijyen durumunun kötü olması (altlık kirli, dışkı var, ıslak zemin)
➤ Buzağının ahırdaki yeri	➤ Sürüde bir önceki yıl ishal şikayetinin olup olmadığı
➤ Altlık biçimi	➤ Sürüde ishal şikayeti
➤ Altlık temizliği	➤ Doğum sonrası ağız sütünün verilmemesi
➤ Altlık temizleme biçimi	➤ Buzağının süt emme biçimi
➤ Ahır çevresinde altlık biriktirme	➤ Sağım öncesi buzağının memeyi emmesi
➤ Ahır çevresinde çamur/toprak/sap-saman/su birikintisi	➤ Sağım öncesi meme temizliğinin yapılıp yapılmadığı
➤ Ahırda yemlik durumu	

Cryptosporidium enfeksiyonları endemik hayvan gruplarında yüksek morbidite (%100) ile seyretmektedir. Ancak bu hayvanlarda mortalite düşüktür. Saf ırkların buzağılarında ve bazı ırklarda (Belçika mavisi, Limouzin, Charolais) mortalite % 30’lara kadar çıkmaktadır (De Graaf 1999).

Kolostrum ve sütte bulunan antikorlar parazitin hareketini ve yayılmasını yavaşlatmaktadır. Bu nedenle yeterince kolostrum alan buzağılarda ciddi klinik

belirtilerin görülmediği ya da engellendiği bildirilmiştir (Olson ve ark. 2004, McAllister ve ark. 2005).

Cryptosporidium parvum türü konak spektrumu en geniş olan türdür. İnsan cryptosporidiosis vakalarında *C. parvum* türü *C. hominis*'ten sonra ikinci olarak gelmektedir. İnsanlara bu protozoonun bulaşmasında sığırlar ve özellikle buzağılar önemli rol oynarlar. *Cryptosporidium parvum*'un sığır genotipi olarak adlandırılan *C. parvum* IIa, *C. parvum* IIb ve *C. parvum* IIc subtip familyaları zoonotik olup, buzağılardan insanlara bulaşmaktadır. Cryptosporidiosisde bulaşma şekilleri; insan-insan, hayvan-insan, su ve gıda olmak üzere dört tiptir. Hayvandan insana bulaşmada *C. parvum* türü yaygındır ve bunda buzağılar önemli rol oynar (O'Handley ve Olson 2006, Fayer ve ark. 2008, Smith 2008, Fayer 2010). Halk sağlığı yönüyle oldukça önemli olan *Cryptosporidium parvum*'un bulaşım kaynakları Şekil 1.3' de gösterilmiştir (Nichols 2008).



Şekil 1.3. *Cryptosporidium parvum*'un bulaşım kaynakları (Nichols 2008).

Hastalık 3 günlüğe kadar olan ruminantlarda görüldüğü halde en yaygın olarak görüldüğü yaş grubu 1-3 haftalıklardır. Enfeksiyona bir aylık üzerindeki hayvanlarda nadiren rastlanmaktadır. Ancak hastalığın yayılışında etkili risk faktörlerinin fazla olması ve salgınların ortaya çıkması her yaş grubunu duyarlı hale getirmektedir (Fayer 2008).

Cryptosporidium enfeksiyonları kendi kendini sınırlayan özellikte olup, ookist atılımı 1-2 hafta kadar devam etmektedir. Enfeksiyonları takiben immunité gelişir ve daha sonraki enfeksiyonlara karşı hayvanlar dirençli hale gelirler. Yani ilk enfeksiyonlarda ookist atılımı daha fazla olur ve yaşla beraber azalmaya başlar. İlk enfeksiyonlar özellikle neonatal dönemde şiddetli seyreder ve klinik cryptosporidiosis oluşmakta ve tedavi edilmezse ölümler şekillenmektedir. *Cryptosporidium parvum* türü daha çok gençlerde yani neonatal dönemde ya da buzağı, oğlak ve kuzularda görülmekte ve yaygınlığı % 100 lere kadar varmaktadır (Fayer 2008).

Cryptosporidium andersoni türü ilk olarak 1987 yılında sığırlarda tespit edilmiştir (daha önce *C. muris* olarak adlandırılıyordu). Koyun ve kuzular deneysel olarak bu türle enfekte edilememiş ancak son yıllarda bir koyunda *C. andersoni* ookistleri saptanmıştır. Prevalansı % 5' ler düzeyinde olup, bazı sürülerde % 30' lara kadar varmaktadır. *Cryptosporidium andersoni* esas olarak süt kesim sonrası yaşlarda yada erişkin sığırlarda görülür ve enfeksiyon genellikle kronik seyirlidir ve aylarca hatta yıllarca devam edebilir (Thompson ve ark. 2005, O'Handley ve ark. 2006, Nichols 2008). Yukarıdaki türlerden başka hakkında daha sınırlı bilgi bulunan *C. bovis* türü ise daha yaşlı buzağılarda görülmektedir (Fayer 2010).

İnsanlarda olguların yaklaşık %50' sini *C. hominis* , % 45 ini *C. parvum* ve kalan % 5 kadarını ise *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* ve geyik genotip oluşturmaktadır. Zoonotik yönü dikkate alındığında bu dağılımda *C. parvum*'un önemli düzeyde olduğu görülmektedir. Bu durumun salgınlarda ve insanlara bulaşımında dikkate alınması gerekmektedir (Thompson ve ark. 2005, O'Handley ve ark. 2006, Nichols 2008).

Bu hastalığa neden olan türlerden *C. parvum* türü en önemli zoonotik tür olup, insan olgularına kişilerin çiftlik ziyaretleri ya da buzağılarla direkt teması sonucu rastlanmaktadır. *Cryptosporidium* türlerinin bulaşmasında genç ruminantlar ve özellikle neonatal dönemdeki hayvanlar risk faktörü olarak rol oynarlar. Çünkü *C. parvum* enfeksiyonlarına 30 günlükten büyük hayvanlarda nadiren rastlanmakta ve yaşlı hayvanlarda atılan ookist sayısı da düşmektedir. Ayrıca yaşlı hayvanlarda *C. andersoni* ve *C. bovis* türleri daha yaygın olarak görülmektedir (O’Handley ve ark. 2006, Thompson ve ark. 2005).

Ookistlerin çevre koşullarına son derece dirençli olmaları bulaşmaya yardımcı olmakta ve hastalığın prevalansını etkilemektedir. Ookistler soğuk ve nemli ortamlarda dirençlidirler. Bu nedenle insanlar arasında epidemik salgınların görülmesinde çoğunlukla su kaynaklı bulaşmalar ön plana çıkmaktadır (Thompson ve ark. 2005, Üner ve ark. 2009).

İnsanlarda bulaşma enfekte hayvanlarla direkt temas, kontamine su ve gıdalar ya da insanların birbirleriyle direkt teması ile olmaktadır (Çetinkaya 2004). Dünyada 1984-1999 yılları arasında Kuzey Amerika, İngiltere ve Japonya’dan içme suyu kaynaklı, *Cryptosporidium* türlerine bağlı 49 adet salgın bildirilmiştir. Şimdiye kadar herhangi bir patojenden kaynaklanan en büyük içme suyu salgını Amerika’nın Wisconsin eyaletinde 1993 baharında 403 bin kişinin etkilendiği *Cryptosporidium* salgınıdır. Salgından 2 yıl sonraki ölüm raporlarına bakıldığında 54 kişinin *Cryptosporidium* türlerine bağlı olarak öldüğü bildirilmiştir (Fayer 2004).

Cryptosporidium enfeksiyonlarının, hayvanlardan insanlara bulaşmasında yoğun olarak buzağılar etkili olmasına rağmen köpek, kedi yavruları ve kemiriciler de rol oynamaktadır. Kırsal alanlarda yaşayanların bu hayvanlarla teması sonucu bulaşma şekillenmektedir. Ayrıca insan ve hayvan dışkılarından elde edilen gübrelerin, sulamada yararlanılan kontamine suların, çiftlik çalışanlarının toprakla bulaşık ellerinin, sebze yetiştiricilerinin sebzelerin kontaminasyonunda önemli rolleri vardır (Fayer ve ark. 2000, Terzi 2005). *Cryptosporidium parvum* hayvanlar arasında besi ve süt sığırlarında, koyun ve domuzlarda oldukça yaygın olarak bulunduğu için

hayvansal kaynaklı gıda maddeleri de büyük risk taşımaktadır. Ayrıca sığır ve koyunların kesilmesi sırasında karkas ve tüketilebilir sakatatlar ookistlerle kontamine olmaktadır (Fayer ve ark. 2000). İnsandan insana bulaşmada aile içi ve toplu yaşanan yerlerde (kreş, çocuk yuvası) genel hijyen kurallarına uyulmaması *Cryptosporidium* vakalarını arttırmaktadır (Sarıkaya 2004).

Seroprevalans çalışmaları sonuçları endüstrileşmiş ülkelerdeki populasyonun %25-35'inin gelişmekte olan ülkelerdeki populasyonun ise %64'ünün *Cryptosporidium* türleri ile enfekte olduğunu ortaya koymuştur (Fahey 2003). Gelişmekte olan ülkelerde enfeksiyonun prevalansı endüstrileşmiş ülkelere oranla daha yüksek seyretmektedir. Bunun sebebinin endüstrileşmiş ülkelerde içme suyuna uygulanan etkili temizlik ve dezenfeksiyon yöntemleri olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca gelişmiş ülkelerde hijyen ve beslenmenin yeterli olmasının etkili olduğu düşünülmektedir. *Cryptosporidiosis*, çocuklar, kötü beslenen kişiler ile AIDS hastaları, kanser için kemoterapi gören hastalar, organ nakli gerçekleştirilen kişiler, immun supresif hastalar gibi immun sistemi zayıflamış kişiler için daha ciddi bir enfeksiyondur (Fayer ve ark. 2000, Ramirez ve ark. 2004).

1.9. Sığırlarda *Cryptosporidium* Türlerinin Dünyadaki Durumu

Dünya'da sığırlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının yaygınlığı, hangi türlerin bulunduğu, zoonotik önemi ve bu hastalığın yayılışında etkili olan risk faktörlerinin durumu ile ilgili araştırmalar son çeyrek yüzyılda daha sık olarak yapılmaktadır. Hastalığın görülme sıklığı ve klinik önemi dikkate alındığında *cryptosporidiosis* ile ilgili araştırmaların daha çok gençlerde yani buzağılarda yapıldığı görülmektedir (Santin ve Trout 2008). *Cryptosporidium* enfeksiyonları dünya'da 106 ülkeden, 79 hayvan türünden bildirilmiştir (Fayer 2008).

İsveç'te sütçü sığırlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları iki aylığa kadar olan buzağılarda % 52, 4-12 aylık genç sığırlarda % 29 ve ineklerde % 5,6 oranında bildirilmiştir (Silverlas ve ark. 2009). Nijerya'da modifiye kinyoun asit fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* türlerinin yaygınlığı altı aydan küçük buzağılarda %

27,4 7-12 aylık genç sığırlarda % 28,1 12 aydan büyük sığırlarda % 19,9 olarak saptanmıştır (Ayinmode ve Fagbemi 2010).

Estonya’da Ziehl-Neelson boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* enfeksiyonları üç aydan küçük buzağılarda % 24, 3-12 aylık sığırlarda % 29, 12 aydan büyük sığırlarda % 37 olarak bildirilmiştir. Bu örneklerin sekizinin PCR sonuçlarında üç aydan küçük buzağılarda bir *C. parvum*, 3-12 aylıklarda ise bir *C. parvum*, bir de *C. andersoni* saptanmıştır (Lassen ve ark. 2009).

Almanya’da 3–15 günlük neonatal buzağılarda asit fast boyama ile % 36 oranında *Cryptosporidium* saptanmış olup, izolatların tümünde PCR-RFLP ile *C. parvum* türü belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada *C. parvum*’un Ila subtip familyası (% 98,1; 52/53) ve IlaA15G2R1 (% 81,1; 43/53) subtipi yaygın olarak bulunmuştur (Broglia ve ark. 2008). Fransa’da anti-*Cryptosporidium* monoklonal antikorları kullanılan ticari ELISA kiti ile yapılan araştırmada, *Cryptosporidium* enfeksiyonları büyük çoğunluğu (% 90,5) ishali olan 4–21 günlük buzağılarda % 43,4 oranında görüldüğü halde, ishal olguları düşük olan (% 5,3) 4–12 günlük buzağılarda % 17,9’lara kadar düştüğü ve çiftliklerin % 55,6’ında görüldüğü belirtilmiştir (Lefay ve ark. 2000).

İmmunofloresan boyama yöntemi (FAT) ile Norveç’te sütçü işletmelerdeki altı aylıktan küçük (3–183 günlük) buzağılarda % 12’inde ve çiftliklerin % 53’ünde *Cryptosporidium* saptanmıştır (Hamnes ve ark. 2006). Çek Cumhuriyeti’nde süttan kesim öncesi ve sonrası etçi ve sütçü işletmelerdeki buzağılarda % 25,8 düzeyinde *Cryptosporidium* gözlenmiş olup, ookistlerin büyüklüğü dikkate alınarak yapılan tanıya göre ise *C. parvum* ve *C. andersoni* türleri tanımlanmıştır (Kvac ve ark. 2006). İngiltere’de ise sığırlardan elde edilen *Cryptosporidium* spp. izolatlarının subtiplendirilmesi ve moleküler epidemiyolojisi üzerine yapılan araştırmada buzağılarda % 28 oranında cryptosporidiosis saptanmıştır. İzolatların çoğunda *C. parvum* olmak üzere *C. bovis* ve *Cryptosporidium* geyik genotipi bulunmuştur. Yapılan sekanslama da ise tüm çiftliklerde Ila subtip familyası ve bu familyaya bağlı altı farklı subtip tespit edilmiştir. En yaygın subtipin ise IlaA15G2R1’in olduğu

bildirilmiştir (Brook ve ark. 2008, 2009).

Kuzey İrlanda'da Ocak-Mayıs ayları süresince neonatal buzağılarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının daha yaygın görüldüğü ve ishallerde % 37,4 oranında *Cryptosporidium* türlerine rastlandığı, neonatal cryptosporidiosisde *C. parvum*'un en yaygın (% 95,1) ajan olduğu, *C. parvum*'un 16 adet subtipi saptandığı ve en yaygın görülenlerin ise IIAA18G3R1 ve IIAA15G2R1 subtipleri olduğu kaydedilmiştir (Thompson ve ark. 2007).

Macaristan'da süt kesim öncesi yaşlardaki buzağılarda *C. parvum*'un iki subtip familyası olan *C. parvum* IIA ve *C. parvum* IID saptanmış olup, IIAA16G1R1 subtipi yaygın (% 71,4) bulunmuştur (Plutzer ve Karanis 2007). Wielinga ve ark. (2008), Hollanda'da sığırlarda *C. parvum*'un insanlarda ise *C. hominis*'in yaygın olarak görüldüğünü, çocuklarda *C. hominis*'in baskın tür olduğu halde 25 yaş üzeri insanlarda *C. parvum* türünün genel olarak görüldüğünü, IIAA15G2R1'in insan ve sığırlarda yaygın görülen subtip olduğunu, bu nedenle sığırların insanlara bulaşmada önemli konak olabileceğini belirtmişlerdir. Portekiz'de ise sığırlardan insanlara bulaşan *C. parvum* IIA ve IID subtip familyaları tespit edilmiştir. Ayrıca hem sığırlarda ve hemde HIV pozitif insanlarda *C. parvum* IIAA15G2R1'in daha yaygın görülen subtip olduğu bildirilmiştir (Alves ve ark. 2006).

Cryptosporidium prevalansı, ABD'nde IFA testi ile iki aylığa kadar olanlarda % 50,3, 3–11 aylıklarda %19,7, PCR ile ise süt kesim öncesi (<2 aylık) % 41 ve süt kesim sonrası (3–11 aylık) % 26,2 olarak bulunmuştur. İki aylığa kadar olan buzağılarda *C. parvum*, 3–11 aylıklarda ise sadece *C. andersoni* görüldüğü halde *Cryptosporidium* geyik tipine her iki yaş grubunda da rastanmıştır (Santin ve ark. 2004). Yine bu ülkede sığırlarda yapılan başka bir çalışmada da 1–8 haftalıklarda % 45,8, 3–12 aylıklarda % 18,5 ve 12–24 aylık sığırlarda % 2,2 oranında *Cryptosporidium* enfeksiyonları saptanmış ve tanıda IFA testine göre PCR'ın daha duyarlı olduğu kaydedilmiştir (Santin ve ark. 2008).

Erişkin sığırlarda enfeksiyon prevalansının düşük düzeyde olması ve *C.*

andersoni'nin yaygın görülmesi nedeniyle 1–2 yaş üzerindeki erişkin sığırların insan enfeksiyonlarında daha düşük risk oluşturduğu (Fayer ve ark. 2007) ve 12–24 aylık sığırlarda *Cryptosporidium* yaygınlığının % 11,9 olduğu, *C. parvum* (% 0,7), *C. bovis* (% 4,2), *Cryptosporidium* geyik genotipi (% 1,8) ve *C. andersoni* (%5,1) türlerinin bulunduğu (Fayer ve ark. 2006) bildirilmiştir. Ayrıca bu ülkede buzağılarda *C. parvum*'un en yaygın tür olduğu, zoonotik olan *C. parvum* IIA subtip familyası ile buna bağlı altı subtipin tespit edildiği kaydedilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ise sığırlarda IIAA15G2R1 subtipinin yaygın olarak görüldüğü belirtilmiştir (Xiao ve ark. 2007, Santin ve ark. 2008).

Kanada'da altı aylığa kadar olan sağlıklı buzağılarda *Cryptosporidium* prevalansı % 6,2, 7–28 günlük buzağılarda % 30, sürü prevalansı % 80 olarak saptanmış ve *C. parvum* türü tespit edilmiştir (Trotz-Williams ve ark. 2008, Coklin ve ark. 2009). Yine bu ülkede buzağılarda *C. parvum*'un % 21,7, *C. bovis*'in % 1,4 oranlarında görüldüğü ve bu prevalans durumları dikkate alındığında *C. parvum*'un zoonotik potansiyeli yönünden Kanada'da baskın tür olduğu belirtilmiştir (Coklin ve ark. 2007).

Arjantin'de ise neonatal buzağılarda *Cryptosporidium* etkenlerinin genel prevalansının % 17 olduğu, bu oranın ishallerde % 37,5'lara kadar çıktığı ve ülkede neonatal buzağı ishallerinde *Cryptosporidium* etkenlerinin ilk sırada yer aldığı bildirilmiştir (Del Coco ve ark. 2008).

Hindistan'da da buzağı ishallerinde bu protozoon önemli bir yer tuttuğu, ishallerde % 32,3–62,5, sağlıklılarda % 22,6–44,4 yaygınlık gösterdiği, *C. parvum* türünün görüldüğü kaydedilmiştir (Singh ve ark. 2006, Paul ve ark. 2008). Zambia'da üç aylığa kadar olan buzağılarda *Cryptosporidium* yaygınlığı % 19,2 olup, bu oran sütçü buzağılarda % 42,8'e ve sütçü çiftliklerde % 75,7'ye kadar çıkmaktadır. Bu ülkede *C. parvum* ve *C. bovis* türleri saptanmış ve bir buzağıda *C. suis* bildirilmiştir (Geurden ve ark. 2006).

İran'da 15 sütçü çiftlikteki 1–20 haftalık 272 buzağının 51'inde (% 18,8)

mZN (modifiye Ziehl Neelsen) boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* ookisti saptanmıştır. Bu pozitif örneklerin tümü PCR ile de pozitif bulunmuştur. İranda buzağılarda *C. parvum* (% 72,6), *C. andersoni* (% 17,7), *C. bovis* (% 7,8) ve *C. parvum* yeni subgenotipi (% 1,9) tespit edilmiş olup, bu türlerden *C. parvum* iki aylığa kadar olan süt kesim öncesi yaşlardaki buzağılarda, *C. andersoni* ise iki aylık sonrası yaşlardaki buzağılarda yaygın görülmüştür (Keshavarz ve ark. 2009). İran'da yapılan bu çalışmadaki buzağılardan elde edilen 25 adet *C. parvum* isolatının sekans analizi ile yapılan subtiplendirme sonucu IIAA15G2R1 (22 örnekte), IIAA16G3R1 (1 örnekte) ve IIAA15G1 (2 örnekte) belirlenmiştir (Nazemalhosseini-Mojarad ve ark. 2011).

1.10. Sığırlarda *Cryptosporidium* Türlerinin Türkiye'deki Durumu

Türkiye'de *Cryptosporidium* türlerinin varlığı ilk olarak 1984'te Bursa Karacabey Tarım İşletmesindeki buzağılarda bildirilmiş olup, bu işletmedeki 51'i ishali olan 56 adet 1–28 günlük buzağının 15'inde (% 26,7) *Cryptosporidium* ookisti saptamıştır (Burgu 1984). *Cryptosporidium* etkenlerinin prevalansı bir aylığa kadar olan diyareli buzağılarda Elazığ yöresinde % 7,2 (Özer ve ark. 1990), Aydın'da % 20,6 (Özlem ve ark. 1997) ve Ankara'da % 48,8 (Irmak ve Şahal 1993) olarak bulunmuştur. Ankara çevresinde yapılan başka bir araştırmada da *Cryptosporidium* ookistlerine ishali buzağılarda % 35,8 oranında rastlanmıştır (Şahal ve ark. 2005).

Cryptosporidium türlerinin yaygınlığı Sivas yöresindeki normal dışkılu buzağılarda % 8–62,4 arasında değişmekle (Mamak ve ark. 2000, Değerli ve ark. 2005) beraber bu oran Erzurum'da % 10 (Sarı ve ark. 2008), Van'da ise % 13,2 (Gül ve ark. 2008) düzeyinde bulunmuştur. Erzurum ve çevresinde sütçü işletmelerdeki ishali üç aylığa kadar olan buzağılarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları % 30,3 oranında gözlenmiştir (Sarı ve ark. 2008).

Türkiye'de yapılan araştırmalarda tanı metodu olarak Carbol fuchsin boyama (Özer ve ark. 1990, Özlem ve ark. 1997), mAF boyama (Değerli ve ark. 2005, Sarı ve ark. 2008) ve Safranin metilen mavisi ile boyama (Emre ve Fidancı 1998)

metotları kullanılmıştır. Ancak Türkiye’de de son yıllarda *Cryptosporidium* tanısında PCR yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Sungur ve ark. (2008), dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* teşhisinde nested PCR ile Carbol fuchsin yöntemlerini karşılaştırmalı olarak incelemişler ve nested PCR’in daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Sevinç ve ark. (2003) ise ELISA metodu ile Konya yöresindeki buzağılarda *Cryptosporidium* prevalansının % 27,3 olduğunu, bu oranın ishallerde % 63,9, sağlıklılarda ise % 9,8 saptandığını ve mAF boyama yöntemi ile genel prevalansın daha düşük (% 20,7) bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca boyama yöntemlerine göre dışkıda *C. parvum* koproantijenlerinin saptandığı ELISA metodunun daha duyarlı olduğu, pozitiflik oranının mZN boyamayla % 2,97 bulunduğu halde ELISA ile bundan daha yüksek (% 9,13) gözlemlendiği kaydedilmiştir (Sevinç ve ark. 2005).

Cryptosporidium türlerinin moleküler prevalansı ve karakterizasyonu ile ilgili yapılan araştırmada ise Nevşehir yöresindeki ishallerde 150 buzağı dışkısı Real Time PCR ile analiz edilmiş olup, incelenen örneklerin 23’ünde (% 15,3) *C. parvum* türü belirlenmiştir. Ayrıca 2 örnek *C. ryanae*, bir örnek ise *C. bovis* olarak değerlendirilmiştir (Şimşek ve ark. 2011). Türkiye’de Aydın ilindeki ishallerde buzağılarda PCR-RFLP ile *C. parvum* türü bildirilmiş olup, bu türün PCR ile yaygınlığı % 24,2 (29/120) olarak bulunmuştur (Aysul ve ark. 2009).

Kars yöresinde 1999–2005 yılları doğum sezonlarında *Cryptosporidium* prevalansı üç aylığa kadar olan ishallerde buzağılarda % 34,2 (171/500) olarak bulunmuştur (Arslan ve ark. 2001, Arslan 2005). Bu yörede adı geçen protozoona neonatal ishallerde buzağılarda % 37,7 (40/106) ve neonatal sağlıklı buzağılarda % 20,9 (9/43) oranında rastlanmıştır (Çitil ve ark. 2004). Yine bu yörede ishallerde kuzularda *Cryptosporidium* yaygınlığı % 38,8 sıklığında saptanmıştır (Sarı ve ark. 2009). Kars yöresindeki buzağılarda mAF boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* oookistleri saptanan 30 dışkı örneğinden elde edilen isolatlarda *C. parvum* türü saptanmış, 15 isolatın yapılan genotiplendirmesinde ise *C. parvum* tip II tespit edilmiştir. Ayrıca multipli polimorfik genetik markerlar kullanılarak yapılan genotiplendirmede, Kars çevresinde birçok işletmede (Merkez-Oğuzlu Köyü ile Arpaçay-Söğütlü Köyü)

karışık genotiplere rastlandığı halde Başgedikler'de karışık genotipin görülmediği kaydedilmiş olup, genel olarak Kars yöresindeki çiftliklerde multilokuslu genotipler yüksek bulunmuştur (Tanrıverdi ve ark. 2003, Tanrıverdi ve ark. 2006).

1.11. Teşhis

Cryptosporidium enfeksiyonlarında en kolay teşhis metodu dışkı ile atılan ookistlerin görülmesine dayanan teşhisdir (Emre ve Fidancı 1998). Dışkıda *Cryptosporidium* ookistleri natif, flotasyon ve çeşitli boyama yöntemleri ile tespit edilebilir. Cryptosporidiosisde ookist atılımının intermitant özellikte olması dışkı muayenelerinde değişik zamanlarda çok sayıda örnek almayı gerektirmektedir (Sears ve Kirkpatrick 2001).

Dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* ookistlerinin saptanması ve diagnostik tanısında çeşitli boyama metotları kolay ve rahat uygulanabilirliği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak ookistlerin dışkıdaki diğer ookist, kist ve mayalarla karıştırılmaması için dikkatli ve uzman kişiler tarafından yapılması gerekmektedir. Bu klasik metotlar kullanılmakla beraber son yıllarda bunlara immun Floresans Antikor (IFA), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Flow sitometri ve moleküler tekniklerden Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, PCR) gibi teknikler eklenmiştir (Sears ve Kirkpatrick 2001, Fahey 2003). Bu teknikler boyama yöntemlerine göre daha duyarlıdır. PCR klinik olgularda yaygın olarak henüz çok fazla kullanılmamaktadır. Ancak moleküler tanıda, epidemiyolojik çalışmalarda, salgınlarda, tür ve genotip ile subtiplerin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. PCR ile gram dışkıda <20 ookist varlığı dahi pozitif sonuç verirken, mikroskopik incelemelerde verim alabilmek için gram dışkıda 100 000 ile 500 000 ookist bulunması gerekmektedir. Bununla beraber PCR'in zaman alması, pahalı olması ve deneyimli personele ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca dışkıdaki birçok madde, polisakkaritler, safra tuzları ve bilirubin PCR aşamasında engelleyici ya da yanlış yorumlanabilecek sonuçlara sebep olabileceğinden bunları ortadan kaldıracak inhibitörler kullanılmalıdır (Sears ve Kirkpatrick 2001).

1.11.1. Direkt Dışkı Muayenesi

Buzağılarda ishalleri dışkı örnekleri genellikle tanı için yeterli miktarda ookist içerdiğinden etkenlerden dengesiz dağılım ve orta şiddette atılım olsa bile natif ve çeşitli boyama metodlarıyla tanı kolaylıkla konabilir. Fakat epidemiyolojik çalışmalarda, kronik hastalıklarda ve insanlarda çok az sayıda ookist atılım durumlarında dışkı örneklerinin konsantrasyonu önem kazanmaktadır (Tüzer ve Toparlak 1999, Sears ve Kirkpatrick 2001, Carey ve ark. 2004, Thompson ve ark. 2005). Alınan dışkı örnekleri sulu ise direkt olarak ya da 2 veya 3 katı kadar sulandırılarak süzülür. Daha sonra bu dışkı örnekleri santrifüj edilerek dipteki sedimentten yaymalar hazırlanır. Yaymalar direk mikroskopta incelenir. Ya da sediment sukroz flotasyon yöntemi ile flote edilerek incelenir (Smith 2008). Yine iodin ile basit boyama yapılarak ookistler (ookistler renksiz, mayalar kahverengi) görülmeye çalışılmaktadır (Starling ve Arrowood 1992). Direkt mikroskopik incelemelerde *Cryptosporidium* ookistleri mayalarla benzerlik gösterdiği için boyasız preparatlarda ookistleri tanımak güçtür. Ancak boyalı preparatlarda bu ayırım daha kolay yapılmaktadır.

Dışkı örnekleri direkt olarak hemen inceleneceği zaman herhangi bir koruyucuya gerek duyulmamaktadır. Ancak uzun süre saklanıp sonra incelenecekse %10 luk formalin, sodyum asetat-asetik asit formalin (SAF) ve polivinly alkol (PVA) fiksatifleri koruyucu olarak (prezervatif) kullanılmaktadır. Boyama metodlarının birçoğunda PVA pek tercih edilmez. Ookist canlılığının uzun süre devamı için dışkı örneklerinin % 2,5' luk potasyum dikromat eklenerek 4°C de saklanması önerilmektedir. Fakat moleküler analizler yapılacaksa formalinde saklanması tercih edilmelidir (Smith 2008).

1.11.2. Boyama Yöntemleri

Cryptosporidium ookistlerinin tanısında kullanılan boyama yöntemleri Safranin-matilen mavisi, Karbol-fuksin, Giemsa, nigrosin, Iodine, Kinyoun asit fast (cold), Modifiye Ziehl-Neelsen, asit fast (hot) ve Modifiye asid fast (hot), gibi boyama yöntemleri ile Auramine rhodamine, Auramin-fenol floresans gibi floresan boyama teknikleridir. Birçok parazitin teşhisinde kullanılan Hematoksilen, Trikrom demir hematoksilen, Polivinil alkol gibi boyama yöntemleri *Cryptosporidium* türlerinin tanısında kullanılmamaktadır (Dubey ve ark. 1990, Starling ve Arrowood 1993, Ok ve ark. 1997, Del Coco ve ark. 2000, Thoma ve Kuhis 2000, Sears ve Kirkpatrick 2001, Bowman 2009).

1.11.2.1. Modifiye Asit-Fast Boyamaları

Cryptosporidium enfeksiyonlarının rutin tanısında ookistleri görmek mayalardan ve dışkıdaki diğer küçük cisimlerden ayırt etmek oldukça güçtür. *Cryptosporidium* ookistleri ilk kez soğuk modifiye Ziehl-Neelsen boyası kullanılarak tespit edilmiş, daha sonra ookistlerin boyanmasında oldukça duyarlı olan asit-fast boyalarının çeşitli modifikasyonları geliştirilmiştir. Bunlardan modifiye asit-fast boyası ısı gerektirirken, Kinyoun'un asit fast boyasında ısıya gereksinim yoktur. Bu yöntemlerin her ikisi de dışkıdan fikse edilmiş yaymalara uygulanabilir. Modifiye asit-fast yöntemi rahat uygulanması, preparatların değerlendirme öncesi bekletilebilmesi, ucuz olması, ookistlerin içyapısını ayrıntılı gösterebilmesi, kırmızı ookistlerin mavi zemin üzerinde kolay ayırt edilmesi ve kalıcı olması nedeni ile *Cryptosporidium* türlerinin tanısında oldukça fazla kullanılmaktadır (Ok ve ark. 1997, Tanrıverdi 2005).

1.11.2.1.1. Modifiye Asit-Fast Yöntemi

Dışkı örneklerinden ishalleri olanlar direkt olarak, normal kıvamlı olanlar ise sulandırılarak parçalandıktan sonra sanrifüj edilmektedir. Sedimentten yayma preparatlar hazırlanarak boyama yapılmaktadır (Ok ve ark. 1997). Boyanarak

hazırlanan preparatlar mikroskopta 40'lık objektifte incelenmektedir (şüpheli durumlarda immersiyon objektifte de incelenmektedir). Her preparatda 10 farklı sahadaki ookist sayısı dikkate alınarak ookist yoğunluğu ve enfeksiyon şiddeti belirlenmektedir. Modifiye asit fast boyama yönteminde ookist yoğunluğu ve enfeksiyon şiddetini belirleme kriterleri Tablo 1.6' da verilmiştir (Burgu 1984, Castro-Hermida ve ark. 2002, Çitil ve ark. 2004, Sarı ve ark. 2009).

Tablo 1.6. Asit fast boyama yönteminde *Cryptosporidium* ookist yoğunluğu ve enfeksiyon şiddeti kriterleri.

Ookist Sayısı	Ookist yoğunluğu	Enfeksiyon şiddeti
Ookist yok	-	-
1-10 ookist	+	Hafif
11-25 ookist	++	Orta
>25 ookist	+++	Şiddetli

Modifiye asit fast boyama yöntemi ile hazırlanan preparatlarda *Cryptosporidium* ookistleri yoğun kırmızı renge boyanır ve birçoğunun içinde birden fazla sayıda siyah muntazam olmayan granüller görülür. Ookistler mavi zemin üzerinde kolaylıkla fark edilir. Mayalar asit-fast olmadıkları için yeşile boyanmaktadır (Ok ve ark. 1997, Tanrıverdi 2005).

1.11.2.1.2. Kinyoun Asit Fast Boyama Yöntemi

Cryptosporidium ookistleri mavi veya soluk kırmızı zeminde açık pembeden kırmızıya çalan renkte boyanmaktadır. Ookistler modifiye asid-fast boyasında olduğu gibi parlak kırmızı değildir. Dışkıda seyrek bulunduğu ve pembemsi boyandığında ookistler gözden kaçabilirler (Mıstık ve ark. 1992, Ok ve ark. 1997).

1.11.2.2. Karbol Fuksin Boyama Yöntemi

Bu yöntemde eter-alkol karışımında temizlenmiş, yağı giderilmiş, lam üzerine bir bağıet yardımı ile bir damla dışkı süspansiyonundan alınır. Aynı miktar karbol-fuksin dışkı damlası yanına konularak bir lamelin köşesi yardımı ile karıştırıldıktan sonra ince bir dışkı frotisi hazırlanır. Hazırlanan bu frotinin 1-2 dakika içerisinde kuruması beklenir. İmmersiyon yağı damlatılıp lamelle kapatılarak 40x10 büyütmede incelenir. Mikroskobun bu büyütmesinde 20 sahadaki ookist sayılarak ortalaması alınır. Boyama sonunda ookistler kırmızı zemin üzerinde şiddetli ışık kırıcı özellikte, düzgün duvarlı ve oval yapıda gözlenirler. Karbol fuksin boyama yönteminde x40'luk objektifte mikrometre ile ayar yapılarak ookistler içinde sporozoitler görülebilir (Burgu 1984, Özlem ve ark. 1997).

1.11.2.3. Safranin-Metilen Mavisi Boyama Yöntemi

Safranin metilen mavisi ile boyanan ookistler turuncu kırmızı renkte etrafı şeffaf bir halka ile çevrili olarak görülür. Ancak ookistin iç yapısı pek fark edilemez. Dışkı kalıntıları ise mavi renkte görülmektedir. Bu yöntemde dışkı süspansiyonundan ince bir froti hazırlanır ve sonra boyamaya geçilir. Boyama sonunda ookistler kolaylıkla ayırt edilmektedir (Fayer ve ark. 2000).

1.11.2.4. Modifiye Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi

Cryptosporidium türlerinin tanısında değeri yüksek bir boyama yöntemidir. Modifiye Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyanan preparatlarda ookistler yapısal özelliklerini korurlar ancak fazla miktarda Ziehl-Neelsen ile boyama maya hücrelerinin yalancı pozitiflik reaksiyonu vermesine neden olabilir. Bu nedenle iyi bir dekolorizasyon işlemi gereklidir. Modifiye Ziehl-Neelsen (MZN) boyama yöntemi sıcak, Modifiye Ziehl-Neelsen (MZN) soğuk boyama yöntemi olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Kesin tanı için 40'luk hatta 100'lük büyütmede inceleme yapılmaktadır. *Cryptosporidium* ookistleri mavi zemin üzerinde kırmızı, koyu kırmızı 4-6 µm çapında yuvarlak yapılar olarak değerlendirilir. Mantar sporları,

bakteriler, dışkı kalıntıları ve asit fast özellik taşımayan yapılar mavi renkte görülürler (Emre ve ark. 1997, Gün ve ark. 1997, Smith 2008).

1.11.2.5. Auramine-Rhodamine Boyama Yöntemi

Auramine-Rhodamine(AR) boyası hücre duvarındaki mikolitik asite afinite gösteren flokrom boyadır. Zıt boya olarak potasyum permanganat kullanılmaktadır. Immunfloresan mikroskop ile 40'lık büyütmede kırmızı zemin üzerinde parlak sarı renkteki oluşumlar *Cryptosporidium* ookistleri olarak değerlendirilir. Boyanın karakteristik rengini alan ookistlerin mantar ve mayalarla karıştırılması çok zordur (Yetkin 1998, Sears ve Kirkpatrick 2001).

1.11.2.6. Auramine Phenol Boyama Yöntemi

Şüpheli dışkı materyallerinde *Cryptosporidium* ookistlerinin saptanmasında kullanılan bir yöntemdir. Dışkı yaymaları hazırlanır, boyanır ve floresans mikroskopta incelenir. Oldukça hızlı bir teknik olup, klinik vakalarda teşhis koymak için yapılmaktadır. Ookistler 10'luk ve 20'lik objektiflerde dahi belirgin olarak görülmektedir. Ayrıca 40 ve 100'lük objektiflerde *Cryptosporidium* ookistlerinin doğruluğu onaylanarak ookist ölçümleri yapılmaktadır (Smith 2008).

1.11.3. İmmunolojik Yöntemler

Parazit hastalıklarının teşhisinde, immunolojik tanı yöntemleri yaklaşık 30 yıl önce kullanılmaya başlanmıştır. *Cryptosporidium* türlerinin teşhisinde Immuno Fluorescence Assay (IFA) ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gibi immunolojik testler geliştirilmiştir (Özcel 1997, Carey ve ark. 2004). Bu immünolojik teknikler boyama yöntemlerinden daha duyarlıdır ve teşhis amaçlı kullanılabilirler (Starling ve Arrowood 1993).

1.11.3.1.İndirek Floresan Antikor Test

İmmunolojik yöntemlerden bir tanesi olan ve monoklonal antikor kullanılarak yapılan IFA testinin özgülüğü oldukça yüksek olup aside dirençli boyama tekniklerinden daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (Emre ve Fidancı 1997, Yetkin 1998). IFA yönteminde ookistlerin antijenik yapıları floresan boya ile işaretli monoklonal antikorlara bağlanarak ookistler siyah zemin üzerinde yeşil renkte görülürler. IFA tekniği ile az sayıda ookist içeren dışkı örnekleri bile saptanabilmektedir. Bu da hastalığa erken dönemde tanı konulmasını ve asemptomatik taşıyıcıların belirlenmesini sağlamaktadır. Pahalı bir teknik olması ve uygulama için floresan mikroskoba ihtiyaç duyulması testin dezavantajlarından (Carey ve ark. 2004).

1.11.3.2.Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Dışkı örneklerinden *Cryptosporidium* ookistlerinin tanımlanmasında kullanılan diğer bir immunolojik yöntem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)'dır (Laurent ve ark. 1999). Enzyme Immun Assay (EIA) olarak da isimlendirilen bu yöntemin esası; oluşturulan antijen-antikor kompleksine enzim ile işaretli, antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen var ise renk oluşumunun gözlenmesidir. Kimyasal bir olay olan renk oluşumu, enzimin aktivitesine bağlıdır. (Ak 1997).

ELISA yöntemi hem hızlı hem de kolay uygulanabilir olması nedeniyle tercih edilmektedir. Ancak dışkıda *Cryptosporidium* ookistlerinin tespitinde kullanılabilecek uygun bir cihaza gereksinim duyulması ve pahalı olması ELISA'nın kullanımını nispeten sınırlamaktadır (Kehl ve ark. 1995).

Dışkıda kopro antijenlerin aranması yöntemide renk oluşumuna dayanan bir yöntemdir. Bu amaçla rapid testler ya da EIA teknikleri kullanılmaktadır. Monoklonal antikor emdirilmiş ELISA mikropaklarına şüpheli dışkı örneği konularak renk oluşumuna göre teşhis edilmektedir.

Aşağıda Tablo 1.7’ de *Cryptosporidium* ookitlerinin identifikasyonunda kullanılan bazı tanı metotlarının avantaj ve dezavantajları verilmiştir (Smith 2008).

Tablo 1.7. *Cryptosporidium* ookitlerinin identifikasyonunda kullanılan tanı metotlarının avantaj ve dezavantajları

Yöntem/Boyama	Sensitivite (duyarlılık, hassasiyet)	Spesifisite (özgüllük, kesinlik)	Hızlılık	İdentifikasyon kolaylığı	Dışkı kıvamı ile ilişkisi	Maliyeti
mZN (modifiye Ziehl-Neelsen)	+	+	++	++	Sıvı dışkılarda daha iyi	++
AP (auramine phenol)	++	++	+++	+++	Sıvı dışkılarda daha iyi	+++
IF (immunofloresans)	+++	+++	+++	+++	Sıvı dışkılarda daha iyi	+
EIA(ELISA)	+++	+++	+++	+++	Dışkının parçalanması gerek	++
IC (immunokromatografik yöntem)	+++	+++	++++	++++	Dışkının parçalanması gerek	++

1.11.4. Moleküler Biyolojik Yöntemler

Serolojik ve kültür yöntemlerinden farklı olarak, aranan organizmanın sadece nükleik asitlerinin varlığını ortaya koymaya yönelik yöntemleri içeren nükleik asidlere dayalı teknolojiler, yüksek ekonomik maliyetlerine rağmen parazitoloji alanında da yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Trotz-Williams ve ark. 2005, Jex ve ark. 2008, Xiao ve Ryan 2008). Bilim dünyasına ilk kez 1985’de kazandırılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, PCR) klinik laboratuvar tanısında yeni bir devir açmıştır. Böylece nükleik asitler (DNA) in vitro olarak bir tüp içinde çoğaltılabilmektedir. PCR reaksiyonu DNA molekülünün iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması, sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA molekülüne bağlanması, uzaması ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanmasını içermektedir (Holland ve ark. 1991). Değişik PCR tipleri ve sekanslama ile tür düzeyinde teşhisler yapılmaktadır. *Cryptosporidium* türlerinin tanı, moleküler epidemiyoloji, genotip ve subgenotiplerinin sınıflandırılmasında SSU rRNA,

HSP70, actin, COWP, ITS-2, TRAP, ML1, ML2 ve GP60 yaygın olarak kullanılan genetik markerlardır. Bunlardan SSU rRNA genin PCR-RFLP ile analizi ve elektroforeze tabi tutulması ile PCR ürününün büyüklüğü (bp) dikkate alınarak tür teşhisleri yapılmaktadır. Bu tip tür identifikasyonlarında sekans analizi ile konfirmasyon yapılması önerilmektedir. *Cryptosporidium parvum* veya *C. hominis* gibi insan ve hayvanlarda önemli olan türlerin subtip familyalarının ve bu familyalara bağlı subtiplerinin belirlenmesinde ise GP60 gen analizi PCR ile yapılmakta ve elde edilen PCR ürününe dizi analizi yapılarak, Gen Bankası'ndaki mevcut dizilimler ile karşılaştırılarak subtipler belirlenmektedir (Trotz-Williams ve ark. 2005, Jex ve ark. 2008, Xiao ve Ryan 2008).

1.12. Tedavi

Cryptosporidiosisin tedavisinde birçok kimyasal madde (çeşitli antiprotozoal bileşikler, geniş spektrumlu antibiyotikler) kullanılmaktadır (Sears ve Kirkpatrick 2001, Xiao ve ark. 2004). Parazitin biyolojisinin tam olarak anlaşılmasının tedaviyi zorlaştırdığı (Üner ve ark. 2007) ve *Cryptosporidium* türlerinin bağırsakta intrasellüler ekstrastoplazmik bulunmalarının kimyasalların etkinliğini azalttığı (Fahey 2003) düşünülmektedir. İshal nedeniyle bozulan sıvı elektrolit dengesini düzeltmeye yönelik sıvı ve elektrolit desteği tedavinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Sıvı elektrolit tedavisinden özellikle normal immuniteye sahip hastalarda çok iyi sonuç alınmaktadır (Sears ve Kirkpatrick 2001, Fahey 2003).

Paromomisin, cryptosporidiosis vakalarında denenen terapötik ajanlardan biridir. Paromomisin, zayıf emilen bir aminoglikozit antibiyotiktir ve hücre kültürlerinde *Cryptosporidium* üremesini engellediği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda paromomisin uygulanan hastalarda dışkıda atılan ookist sayısında ve ishal sıklığında azalma gözlenmiştir. *Cryptosporidium* tedavisinde denenen bir başka ajan sipramisinidir. Ancak sipramisin ile elde edilen sonuçlar çelişkilidir. AIDS'li hastalarda azitromisin uygulamasından olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Monensin ve halofuginon yüksek dozlarda (0,8 mg/ml) kullanıldıklarında parazit gelişimini azalttıkları yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Thoma ve Kuhis 2000,

Taylor 2007). Yine buzağılarda klinik cryptosporidiosis olgularında, lasalocid-Na, β -cyclodextrin, α -cyclodextrin, decoquinate, sinefungin, nitazoxanide, latrazuril veatovaquone gibi anticryptosporidial ilaçlar tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Thompson ve ark. 2005, Stockdale ve ark. 2008).

1.13. Korunma ve Kontrol

Cryptosporidiosisin bulaşmasında ve salgın hale gelmesinde genç hayvanların önemli bir yeri vardır. *Cryptosporidium* enfeksiyonları gençlerde ishale neden olmaktadır. İshalli buzağılarda ookist atılımının ve ookist yoğunluğunun yüksek olduğu bildirilmiştir. Enfekte buzağuların dışkılarıyla attıkları ookistler diğer buzağular için ve zoonotik olarak da insanlar için önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır. Doğaya atılan bu ookistler çevre şartlarına ve dezenfektanlara oldukça dirençlidirler. Suların ve gıdaların kirlenmesi ile fekal-oral bulaşmaya sebep olurlar. Ergin sığırlarda uzun süren subklinik enfeksiyonlar ciddi bir ookist yayılmasına sebep olmaktadır. Buda aynı ahırda bulunan buzağular için risk faktörü oluşturmaktadır (Thompson ve ark. 2005, Bowman 2009).

İşletmedeki buzağuların anneleri ile bir arada olması, sığır ve buzağı sayısının fazla olması, kalabalık yetiştirme, sürü büyüklüğü gibi faktörler *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının yaygınlığında rol oynamaktadır. Sütçü işletmelerde buzağı sayısının fazla olması ve buzağuların dışkı ile fazla ookist çıkarması bu işletmelerde enfeksiyonların daha yaygın olmasına sebep olmaktadır. Yine yetiştirme tipi (kapalı veya yarı açık) iklim, havanların merada olup olmaması, yaşlılarla bir arada bulunma, altlık durumu, su içme düzeni, su içme şekli, altlık temizleme biçimi ve sıklığı, hayvan sayısı, farklı yaş gruplarındaki hayvanların aynı bölmelerde bulunması gibi çeşitli faktörler cryptosporidiosisin yayılışında etkili faktörler olarak sayılabilir. Bunun için hijyen, güvenli su ve yetiştirme tiplerine dikkat edilmelidir (Thompson ve ark. 2005, O’Handley ve Olson 2006, Starkey ve ark. 2006, Nichols 2008, Silverlas ve ark. 2009).

Ookistlerin uzun süre dış ortamda canlı kalmaları ve bir çok dezenfektana dirençli olmaları, az sayıda ookistin enfeksiyon oluşturma yeteneğine sahip olması, bazı genotipler için hayvanların rezervuar olmaları ve konağın bağışıklık sisteminin baskılanmış olması cryptosporidiosisin yayılmasında etkili olduğu için önlemler alınmalıdır (Truong 2006, Fayer 2008).

Cryptosporidiosis neonatal buzağılarda önemli bir gastroenterit sebebidir. Atıldığı andan itibaren enfektif olan ookistlerin bulaşım kaynaklarının önüne geçilmelidir. Özellikle fekal-oral bulaşmaya sebep olabilecek risk faktörlerinin önüne geçilmelidir. Bu sebeple hayvanlar tek tek barındırılmalı, bokslar, yerler, kullanılan araç ve malzemeler sıcak suyla yıkanmalı, her hayvan için ayrı ayrı su kovası kullanılmalı, altlık sık değiştirilmeli, sağlıklı hayvanlar ishallilerden ayrılmalı buzağılar anneleri ile bir arada barındırılmamalı, yemlik ve samanlıkların dışkı ile bulaşmasına engel olunmalıdır (Thompson ve ark. 2005).

İnsanlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarında bulaşma kaynaklarının önüne geçilerek önemli bir koruma sağlanmış olunur. *Cryptosporidium* türlerinin en önemli bulaşma kaynağı kontamine sulardır. Ayrıca kişiden kişiye ve kontamine gıdalarla bulaşma şekillenmektedir. Büyük salgınlar genellikle birçok kaynaktan gelen içme suyundan veya dinlenmiş suyla temastan ortaya çıkmaktadır. Bulaşma yolları içerisinde; yüzme havuzları, göl, kişiden kişiye doğrudan veya dolaylı bulaşma, çiğ süt içilmesi, enfekte hayvan ile temas, kontamine sebze ve meyvelerin yenilmesi gibi faktörler sayılabilir. Bu nedenle isanlar bu konuda bilinçlendirilmelidir (Çeber ve ark. 2005).

Ayrıca *Cryptosporidium* ookistleri birçok dezenfektana karşı dirençlidir. Ancak %10'luk formalin, % 5'lik amonyak parazitleri tahrip ettiği için kontaminasyonların önlenmesinde, fumigasyon şeklinde kullanılabilir (Mıstık ve ark. 1992).

Cryptosporidium türlerinin bulaşma şekilleri göz önüne alınarak özellikle immun yetmezlikli hastalar sularını kaynatmadan içmemeli, insan ve hayvan

dışkılarıyla temas etmemeli, ve genel hijyen kurallarına uymalıdır (Sarıkaya 2004).

Sonuç olarak yukarıda ana hatlarıyla anlatılan *Cryptosporidium* etkenleri ve neden olduğu cryptosporidiosisın son bir asırdır belirlenmiş olması, insan ve hayvanlarda salgınlar oluşturması açısından önemli olduğu görülmektedir. *Cryptosporidium* adlı intestinal protozoonlar evcil hayvanlarda ve özellikle çiftlik hayvanlarından olan sığır ve koyunlarda hem zoonotik önemi hem de ekonomik önemi nedeniyle dikkati çekmeye devam etmektedir. Bu nedenle son yıllarda tüm Dünya’da *Cryptosporidium* türleriyle ilgili çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Klinik olarak *Cryptosporidium* enfeksiyonları yıl, iklim ve ülkelere göre değişmekle beraber buzağılarda % 30’lar dolayındadır. Enfekte buzağuların dışkıları ile fazla oookist atmaları bulaşmada önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır.

Kars yöresinde bugüne kadar sadece üç aylığa kadar olan ishalleri buzağılarda araştırma yapılmıştır. Normal dışkıları olan buzağılarda oldukça sınırlı inceleme olmuştur. Daha ergin sığırlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının durumu bilinmemektedir. Ayrıca yöntem olarak da sadece mAF boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* oookistleri incelenmiş ve cins/soy düzeyinde tanı konulmuştur. Kars çevresindeki buzağılardan elde edilen az sayıdaki örnekte *C. parvum* türü ve zoonotik olabilecek tip II saptanmıştır. Ancak zoonotik ve patojen tür olan *C. parvum*’un hangi subtiplerinin görüldüğü bilinmemektedir.

Tüm bu nedenlerden dolayı bu çalışma planlanmış, projelendirilmiş ve yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı; Kars ve çevresindeki sığırlarda cryptosporidiosis etiolojisinde rol alan *Cryptosporidium* türlerini belirlemek, buzağı ve ergin sığırlarda hangi *Cryptosporidium* türlerinin bulunduğunu ortaya koymak, buzağı ve ergin sığırlarda *Cryptosporidium* türlerinin görülme oranını saptamak, isalleri ve sağlıklı hayvanlarda hangi *Cryptosporidium* türünün bulunduğunu tespit etmektir. Ayrıca *Cryptosporidium parvum*’un tip ve subtiplerini belirleyerek özellikle isalleri olgulardaki *Cryptosporidium parvum* tip ve subtipleri tanımlamak ve zoonotik *Cryptosporidium parvum*’un potansiyel zoonotik önemini ortaya koymaktır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışma Periyodu ve Odakları

Çalışma 2010 yılı buzağılama sezonu olan Şubat-Haziran ayları arasında Kars merkez ve yöresini yansıtacak 30 köy yerleşiminde (odak) bulunan 62 çiftlikte (ahır) yapılmıştır. Araştırma materyalinin toplandığı yerleşim yerleri Şekil 2.1’de sunulan haritada gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Materyal toplanan yerleşim yerleri

Bu odak ve çiftliklerin seçiminde daha önce çalışmaların yapıldığı odaklar öncelikle tercih edilmiştir. Ayrıca klinik durum (ishal, sağlıklı), sürü büyüklüğü, buzağı sayısı ve yaş durumu (buzağı, inek), ulaşım kolaylığı ve çiftlik sahiplerinin izni dikkate alınarak odak ve çiftliklerin seçim yapılmıştır.

Cryptosporidium türlerinin moleküler karakterizasyonunda ise Modifiye Asit Fast (mAF) Boyama Yöntemi ile pozitif olarak değerlendirilen 2010 yılı buzağılama sezonuna ait 110 *Cryptosporidium* izolatu ile 2011 buzağılama sezonuna ait 19 *Cryptosporidium* izolatu kullanılmıştır. Bu izolatların dağılımı ise ishallerli buzağı (n=47), sağlıklı buzağı (n=28) ve sağlıklı ergin sığır (n=54) şeklinde olmuştur.

2.1.2. Çalışmanın Yapıldığı Bölgenin Özellikleri

Kars yöresi 1700–1800 rakımlı olup, bir plato şeklindedir. Arazi yapısı çayır, mera ve ekilen alanlardan oluşmaktadır. Tarım bitkileri arasında buğday ve arpanın yanında korunga, fiğ gibi kaba yem bitkileri gelmektedir. Bu yörede yıllara göre değişmek üzere 6–8 ay (Kasım-Nisan veya Ekim-Mayıs) kadar devam eden kış süresince kapalı yetiştirme yapılmaktadır. Nisan veya Mayıs ayı itibarı ile ise hayvanlar merada bulunmaktadır. Bu yörede buzağı doğumları genellikle Şubat-Mart aylarında olmaktadır. Bu nedenle buzağı sayısı en fazla bahar aylarında görülmektedir. Barınak tarzı ise çoğunlukla taş veya betonarme tarzda olup, çatısı toprak veya sac kaplamadır. Doğumu takiben buzağılar aynı ahır da fakat farklı bölmelerde bulunmaktadır.

Hayvancılık genellikle bir köyde ortak sürü ve ortak mera kullanımı şeklindedir. Ayrıca kendine ait bağımsız mera alanları olan çiftliklerde bulunmaktadır. Sığır yetiştiriciliği aile işletmeciliğinden modern işletmeciliğe geçiş aşamasındadır. Hızlı bir şekilde ortalama 25–50 baş sığırdan oluşan orta ölçekli işletmelerin sayısının gün geçtikçe arttığı görülmektedir. Hayvanların içme su kaynakları kışın ahırda şebeke suyu, yazın ise meradaki göl, gölet veya akarsulardır. Hayvan beslemede ot ve saman başta olmak üzere kaba yem bitkileri ve yem sanayi ürünleri kullanılmaktadır. Bölgede son zamanlarda köy yerleşimleri dışında bağımsız

çiftliklerin artmaya başladığı görülmektedir. Gerek köylerde ve gerekse bağımsız çiftliklerde ahır, mera ve içme su manzarası ilginç bir durum oluşturmaktadır. Bu manzara ile ilgili bir alan ve araştırma materyalinin toplandığı yerleşim yerlerinden görüntü Şekil 2.2' de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Araştırma materyalinin toplandığı yerleşim yerlerinden bir görüntü

2.1.3. Dışkı Örnekleri

Araştırma materyalini oluşturan dışkı örnekleri Kars yöresinde ziyaret edilen odaklardaki ahır/çiftliklerdeki sığırların rektumlarından direkt olarak alınmıştır. Çalışmada 30 yerleşim yerindeki 62 çiftlikte bulunan 430 buzağı, 440 inek olmak üzere toplam 870 dışkı örneği alınmıştır.

Klinik olarak ishelli buzağı tespit edilen bu işletmelerdeki hayvanların % 75 civarından (ortalama $\frac{3}{4}$ 'den) materyal alınmıştır. Hayvan sayısı az olan ahırlarda örnek alma oranı % 100'lere varmış, hayvan sayısı fazla olan işletmelerde ise bu oran % 60'lara kadar düşmüştür. Ahırlardaki toplam buzağının ise % 96'sından dışkı örneği alınmıştır. Araştırma materyalinin alındığı tarih, yerleşim yeri, ahır kodu ve ahırdaki hayvan sayıları ve ahırdan örnek alma % oranı Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Araştırma materyali yerleşim yeri, ahır ve ahırdaki hayvan sayıları

Materyal Alma Tarihi	Yerleşim Yeri/Odak	Örnek Alınan Ahır/Çiftlik Sayısı	Ahırdaki Toplam Hayvan Sayısı			Materyal Alınan Hayvan Sayısı			
			Buzağı	İnek, düve	Sürü * Büyüklüğü	Buzağı	İnek, düve	Toplam	Örnek Alınma oranı %
27.02.2010	Cumhuriyet	CUM1	10	22	32	10	16	26	81.25
01.03.2010	BüyükAküzüm	BAK1	6	0	6	6	0	6	100
04.03.2010	Boğazköy	BGK1	9	36	45	9	24	33	73.33
08.03.2010	Karakaş	KAR1	15	12	27	15	4	19	70.37
09.03.2010	Başgedikler	BGD1	4	10	14	4	6	10	71.42
09.03.2010		BGD2	6	0	6	6	0	6	100
12.03.2010	Alaca	ALC1	9	12	21	9	9	18	85.71
15.03.2010	Oğuzlu	OGZ1	5	24	29	5	16	21	72.41
16.03.2010	Çağlayan	CAG1	8	20	28	8	10	18	64.28
19.03.2010	Gelirli	GEL1	8	19	27	8	13	21	77.77
23.03.2010	Verimli	VRM1	6	10	16	5	9	14	87.50
23.03.2010		VRM2	4	8	12	3	8	11	90.90
23.03.2010		VRM3	5	0	5	5	0	5	100
29.03.2010	Dikme	DIK1	6	12	18	6	11	17	94.44
29.03.2010		DIK2	6	7	13	6	6	12	92.30
30.03.2010	Ataköy	ATA1	9	18	27	9	15	24	88.88
30.03.2010	Azat	AZT1	12	22	34	12	10	22	64.70
31.03.2010	Karakale	KRK1	15	23	38	15	17	32	84.21
01.04.2010	Hacihalil	HCH1	7	25	32	7	13	20	62.50
01.04.2010		HCH2	7	13	20	7	7	14	70.00
02.04.2010	Kümbetli	KUM1	4	17	21	4	12	16	76.19
02.04.2010		KUM2	3	7	10	3	5	8	80.00
02.04.2010		KUM3	7	12	19	7	7	14	73.68
02.04.2010		KUM4	3	5	8	3	5	8	100
12.04.2010	Başkaya	BSK1	8	10	18	7	6	13	72.22
12.04.2010		BSK2	8	20	28	6	11	17	60.71
14.04.2010	Aydıncalan	AYD1	3	9	12	3	8	11	91.66
14.04.2010		AYD2	5	7	12	4	4	8	66.66
15.04.2010	Akbaba	AKB1	10	10	20	8	8	16	80.00
15.04.2010		AKB 2	15	14	29	13	9	22	75.86
15.04.2010		AKB 3	3	5	8	3	4	7	87.50
15.04.2010		AKB 4	5	9	14	5	8	13	92.85
21.04.2010	Subatan	SUB1	10	12	22	10	5	15	68.18
21.04.2010		SUB 2	7	0	7	7	0	7	100
21.04.2010		SUB 3	8	14	22	7	10	17	77.27
22.04.2010	Sögütlü	SGT1	7	5	12	7	2	9	75.00
22.04.2010		SGT2	14	7	21	10	3	13	61.90
27.04.2010	Benliahmet	BAH1	4	8	12	4	7	11	91.66
27.04.2010		BAH2	3	5	8	3	3	6	75.00
27.04.2010		BAH3	11	9	20	11	7	18	90.00
04.05.2010	Çakmak	CAK1	8	19	27	8	9	17	62.96
04.05.2010		CAK2	8	24	32	8	13	21	65.62
05.05.2010	Esenyazı	ESY1	9	9	18	9	7	16	88.88
05.05.2010		ESY 2	11	12	23	10	7	17	73.91
05.05.2010		ESY 3	5	6	11	5	3	8	72.72
05.05.2010		ESY 4	4	5	9	4	5	9	100
05.05.2010		ESY 5	4	6	10	4	6	10	100
05.05.2010		ESY 6	6	0	6	6	0	6	100
05.05.2010		ESY 7	10	0	10	10	0	10	100
08.05.2010	Halefoğlu	HLF1	6	16	22	6	9	15	68.18
08.05.2010	Bulanık	BUL1	12	15	27	13	12	25	92.59
08.05.2010		BUL2	5	6	11	5	3	8	72.72
10.05.2010	Karacaören	KRC1	6	15	21	5	11	16	76.19
10.05.2010		KRC2	4	16	20	2	11	13	65.00
13.05.2010	Hasçiftlik	HSC1	4	6	10	4	5	9	90.00
13.05.2010		HSC2	9	0	9	9	0	9	100
13.05.2010		HSC3	9	13	22	9	4	13	59.09
15.05.2010	Karaçoban	KRB1	12	9	21	12	1	13	61.90
15.05.2010		KRB2	8	6	14	8	1	9	64.28
18.05.2010	Yaylacık	YAY1	6	14	20	5	10	15	75.00
18.05.2010		YAY2	3	5	8	3	3	6	75.00
18.05.2010		YAY3	5	5	10	5	2	7	70.00
Toplam	30 Odak	62 Ahır	449	685	1134	430	440	870	76.71

*Ahır/Çiftlikteki toplam hayvan sayısı (örnek alınan işletmedeki toplam hayvan sayısı)

Çalışma materyalinin toplandığı odakların seçiminde dikkate alınan risk faktörlerine ilaveten çiftlikteki buzağuların yaşlı hayvanlar ile bir arada bulunup bulunmaması, buzağı altlık durumu, süt emip emmemesi ve hayvanların içme suyu kaynağı gibi risk faktörleri göz önüne alınarak anket hazırlanmıştır. Hazırlanan bu anketler 62 çiftlikte uygulanmıştır.

Çalışmada dışkı örneği alınan ahırların 60'ndan buzağı altlık örneği de alınmıştır. Alınan dışkı örnekleri Kafkas Üniversitesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına getirilmiş ve buzdolabında +4°C'de saklanmıştır. Modifiye Asit Fast (mAF) Boyama Yöntemi ile *Cryptosporidium* saptanan dışkı örnekleri iki kısma ayrılarak – 20 °C'de dondurularak saklanmıştır.

Çalışmanın moleküler karakterizasyon kısmında kullanılan modifiye asit fast (mAF) boyama yöntemi ile pozitif olarak değerlendirilen 129 örneğin odak, yaş ve klinik duruma göre dağılımı Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Moleküler karakterizasyonu yapılan çalışma materyalinin yerleşim yeri, yaş ve klinik durumuna göre dağılımı.

Yerleşim Yeri (Odak)	Moleküler			
	Karakterizasyonu Yapılan Örnek Sayısı	Hayvanın Yaşı ve Klinik Durumu		
		İshalli Buzağı (3 gün–3 ay)	Sağlıklı Buzağı (3 gün–3 ay)	Ergin sığır (>1 yaş)
Akbaba	23	10	5	8
Alaca	3	3	0	0
Aydıncalan	10	2	2	6
Büyükaküzüm	5	4	1	0
Başgedikler	5	3	0	2
Başkaya	7	0	4	3
Boğazköy	6	2	1	3
Cumhuriyet	11	5	0	6
Çağlayan	5	1	2	2
Dikme	8	0	2	6
Gelirli	5	2	1	2
Hacıhalil	2	0	1	1
Karakale	3	1	0	2
Karakaş	3	2	1	0
Kocabahçe	1	1	0	0
Kümbetli	20	3	5	12
Söğütlü-Arpaçay	6	3	2	1
Subatan	2	1	1	0
Söğütlü-M-Klinik	1	1	0	0
Yaylacık-Klinik	2	2	0	0
Hasçiftlik-Klinik	1	1	0	0
Toplam	129	47	28	54

2.2. Metot

2.2.1. Modifiye Asit Fast (mAF) Boyama Yöntemi

Dışkı örneklerinden ishalleri olanlar direkt olarak, normal kıvamlı olanlar ise sulandırılarak parçalandıktan sonra 15 ml'lik santrifüj tüplerine 5-10 ml alınarak üzerine su eklenmiş ve santrifüj sedimentasyon (3000 rpm/5dk.) yapılmıştır. Santrifüj sonrası üst kısım atılmış ve dipteki pellet ya da çökelti vortekslenmiştir. Hazırlanan bu sedimentten yayma preparatlar hazırlanarak boyama işlemi yapılmıştır (Ok ve ark. 1997).

Bu yöntem için bazik fuksin, % 95 etil alkol, fenol kristalleri, konsantre sülfürik asit, metilen mavisi, potasyum hidroksit (% 10 ve % 0.01 sulu solüsyonları) ve % 10 formol kullanılmıştır.

2.2.1.1. Hazırlanan Solüsyonlar

Karbol fuksin boyası

- a) Boyayı ezmek için havan ve havaneli kullanarak 3.15 gr fuksin 100 ml % 95 etil alkol içinde eritilmiştir (bazik fuksin topaklaşmışsa alkolü ekmeden havaneli yardımı ile iyice toz hale getirilmiş, daha sonra alkol damla damla eklenmiş ve iyice ezilmiştir).
- b) Fenol kristalleri 56 °C'lık su banyosunda eritilmiş ve 45 ml erimiş fenol kristaline toplam hacim 900 ml oluncaya kadar distile su ilave edilmiştir.
- c) Fuksin alkol karışımı fenol solüsyonuyla karıştırılmış 1-2 gün bekletilmiş ve solüsyon süzülerek kullanılmıştır.

% 5 Aköz sülfürik asit (dekolorizan ajan)

Sülfürik asitten 5 ml dikkatli ve yavaş bir şekilde 95 ml distile suya eklenerek hazırlanmıştır.

Loeffler'in alkali metilen mavisi (karşıt boya)

Metilen mavisinden 0.3 gr 30 ml etil alkolde eritilmiş ve 100 ml % 0.01 potasyum hidroksit solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır (Ok ve ark. 1997).

2.2.1.2. Boyama Yöntemi

1. Yayımlar havada kurutulmuş ve lamlar alevden yavaşça geçirilerek fikse edildikten sonra soğumaya bırakılmıştır.
2. Lamlar boyama sehпасı üzerine yere paralel gelecek biçimde yerleştirilmiş ve üzerlerine lamları tam kaplayacak biçimde karbol-fuksin boyası dökülmüştür.
3. Elli santimetre kadar uzunluktaki bir kalın tel çubuğun ucuna pamuk sarılmış, alkolle ıslatıldıktan sonra yakılarak, lamların altında gezdirilmiştir.
4. Lamlar kurumaya başladığı zaman üzerlerine boya eklenmiştir. Isıtma işlemi 5 dakika sürdürülmüştür. Boyanın kaynamamasına özen gösterilmiştir.
5. Lamlar soğuduktan sonra fazla boya dökülerek hafif akan çeşme suyunda yıkanmıştır.
6. Lam dekolorizasyon ajan olarak % 5'lik sulu sülfürik asit içeren şaleye batırılıp 1 dk tutulmuştur.
7. Şaleden çıkarılan lamlar hafif akan çeşme suyunda yıkanmış ve tekrar boyama sehпасı üzerine dizilmiştir.
8. Lamların üzerine Loeffler'in alkali metilen mavisi dökülüp (preparatın üzerini tam kaplayacak şekilde) 1 dk beklenmiş, daha sonra lamlar musluk suyunda yıkanıp kurutulmuştur.
9. Boyanarak hazırlanan preparatlar mikroskopta 40'luk objektifte incelenmiştir (şüpheli durumlarda immersiyon objektifte de incelenmiştir).

Her preparatta 40'lık objektifte 10 farklı sahadaki ookist sayısı dikkate alınarak ookist yoğunluğu ve enfeksiyon şiddeti belirlenmiştir. Dışkıda ookist yoğunluğunun kantitatif olarak değerlendirilmesi ve preparatlardaki ookist sayılarına göre enfeksiyon şiddetinin yorumlanmasında daha önce yapılan laboratuvar çalışmaları ve diğer ilgili literatürlerden (Burgu 1984, Castro-Hermida ve ark. 2002, Çitil ve ark. 2004, Sarı ve ark. 2009) modifiye edilerek hazırlanan Tablo 2.3' deki kriterler dikkate alınmıştır.

Tablo 2.3. Dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* ookist yoğunluğu ve enfeksiyon şiddeti kriterleri.

Ookist Sayısı	Ookist yoğunluğu	Enfeksiyon şiddeti
Ookist yok	-	-
1-10 ookist	+	Hafif
11-25 ookist	++	Orta
>25 ookist	+++	Şiddetli

2.2.2. Buzağı Altılık Örneklerinin İncelenmesi

Materyal toplanan 62 çiftliğin 60'ındaki buzağı bölmelerinden alınan altılık, örneğine göre 1-2 lt distile su eklenerek yıkama işlemi yapılmıştır. Hazırlanan bu altılık solüsyonu 150 mikronluk elekten süzülerek 24 saat dinlendirilmiştir. Daha sonra üst kısım (3/4 kadar) atılarak dipteki kısım 3000 rpm/5dk santrifüj edilmiştir. Sedimentden yaymalar hazırlanarak modifiye asit fast (mAF) boyama yapılmıştır.

2.2.3. Dışkı Örneklerinden *Cryptosporidium* Ookist İzolatlarının Elde Edilmesi

Modifiye asit fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* saptanan dışkı örneklerinden tuzlu su flotasyon yöntemi ile (doymuş tuzlu suyun spesifik yoğunluğu 1.2; 390 gr NaCl + 1000 ml su) ookistler elde edilmiştir. Bu işlem için ishali dışkılarda direkt olarak, normal dışkılarda ise distile su ile sulandırıldıktan sonra 50 cc'lik falcon tüplerine süzülmüştür. Daha sonra ise santrifüj sedimentasyon ve

santrifüj flotasyon yöntemleri ile ookistler elde edilmiştir.

Dışkıdan ookist izolatu elde edilmesinde sırası ile aşağıdaki işlemler yapılmıştır

1. Bir miktar dışkı 50 cc kadar distile su ile karıştırılıp, 150 µm'lik süzgeçten süzölmüştür. Süzöntü 50 ml'lik falcon tüplerine alınarak 3600 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp, dipte kalan pellet distile su ile süspanse edilmiş ve 3600 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek yıkama işlemleri tekrarlanmıştır.
2. Süpernatant atılıp dipte kalan pellet, üstündeki az sıvı ile karıştırılmış ve 10 ml'lik falcon tüplerine alınmıştır. Yıkama işlemleri tekrarlandıktan sonra üzerine 10 birim eter + 35 birim dışkı süspansiyonu olacak şekilde ilave edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra 3600 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
3. Santrifüjden sonra üstteki kısımlar (mukus + yağ + eter-su) atılmış ve dipte kalan pellet (ookist + partikül) distile su ile 2 kez yıkanmış ve dipte kalan pellet bir miktar distile su ile homojenize edilmiştir (~ 1 ml kadar).
4. Bu karışımın üzerine 12 ml doymuş tuzlu su eklenip iyice karıştırılmış ve üzerine +4 °C de saklanan distile sudan 1 ml faz oluşturacak şekilde yavaşça ilave edilmiştir. Daha sonra 3600 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
5. Tüpler çalkalanmadan alınarak distile su fazının hemen altında ince bulut tarzında biriken ookistler pipet yardımı ile başka bir tüpe aktarılmıştır. Tüpün üzeri distile su ile tamamlanarak 3600 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
6. Süpernatant atılmış pellet vortekslenerek üzeri distile su ile tamamlanmış ve 3600 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak yıkama işlemleri yapılmıştır.
7. Elde edilen 1 ml'lik *Cryptosporidium* ookist izolatu üzerine 500 µl distile su ilave edilerek 1,5 ml lik eppendorflara alınmış ve DNA ekstraksiyonu yapılanaya kadar -20 °C saklanmıştır (Tanrıverdi 2005, Aysul ve ark. 2009).

2.2.4. DNA Ekstraksiyonu

Cryptosporidium ookistleri içeren dışkı sedimentinden kolon purifikasyon dışkı kiti (DNA Stool Kiti, DNA ekstraksiyon kiti) kullanılarak total DNA elde edilmiştir. Modifiye asit fast boyama ile *Cryptosporidium* yönünden pozitif değerlendirilen 129 dışkı örneği DNA ekstraksiyonu işlemine tabi tutulmuştur. Bu aşamada ayrıca birkaç kez dondurma çözme işlemleri yapılarak ookistlerin parçalanması sağlanmıştır. Klasik yöntem veya kit kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılan 129 örneğin 109'undan elde edilen total (genomik) DNA ekstraksiyonu kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır (Xiao ve Ryan 2008). Dışkı örneklerinden QIAamp DNA Dışkı Kiti Kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Ancak çalışmada klasik yöntemlerle de DNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

2.2.4.1. Dışkı Örneklerinden (QIAamp DNA Dışkı Kiti Kullanarak) DNA Ekstraksiyonu

1. Distile su içerisinde stoklanan *Cryptosporidium* ookist izolatu 6000 devir/10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet vorteksle çözdürülmüş, -80 °C'de 15 dk dondurulmuştur. Dondurma işleminden sonra oda ısısında çözdürülmüştür. Bu işlem üç kez tekrarlanmıştır.
2. Dışkı örneğinden 200 µl alınarak 2 ml'lik microfuge tüpüne (mikrosantrifüj tüpü, eppendorf tüpü) konulmuştur.
3. Distile su eklenerek en az iki kez santrifüj edilmiştir (10 000 devir/10 dk).
4. Pellete 1M Dithiothreitol (DTT) 18,6 µl ve 1M KOH 66,6 µ eklenmiş ve bir pipet ucu ile iyice karıştırılmıştır.
5. İnkübe edilmiştir (65 °C de 15 dk).
6. 8.6 µl % 25 HCl ve 160 µl 2-M Tris-HCl (pH 8,3) ile nötralize edilip vortekslenmiştir.
7. 250 µl fenol+kloroform+izoamil alkol (25:24:1) solüsyonu tüpe eklenmiş, vortekslenmiş ve santrifüj edilmiştir (10 000 devir/ 5 dk).
8. Supernatant 2 ml'lik eppendorf (microfuge tüpü) tüplerine alınmıştır.

9. Supernatant üzerine QIAamp DNA dışkı kiti içinde bulunan buffer ASL'den 1,4 ml (QIAGEN Inch, QIAGEN-Buffer ASL) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Karışım 70°C de 5 dakika inkübe edilmiş. Örnekler vortekslenip 1 dk yüksek devirde santrifüj edilmiştir.
10. Oluşan süpernatantdan 1,2 ml alınıp yeni bir tüpe aktarılmış, diğer tüp atılmıştır.
11. Her örneğe 1 adet Inhibitex tablet ilave edilmiş ve vortekslenmiştir. Daha sonra 1 dk oda ısısında bekletilmiştir.
12. Üç dakika 10 000 devirde santrifüj edilmiş.
13. Süpernatant yeni bir tüpe aktarılmış, diğer tüp atılmış, tekrar 10 000 devir/ 3 dk santrifüj edilmiştir.
14. Süpernatantdan 200 µl yeni bir tüpe alınmış, üzerine 15 µl Proteinaz-K eklenmiştir. Süspansiyona 200 µl Buffer AL eklenmiş ve 15 saniye vortekslenildikten sonra 70 °C 10 dk bekletilmiş, 200 µl etanol eklenmiş ve karıştırılmıştır.
15. Kit içindeki kolonlar hazırlanmış ve süspansiyon kolonlara aktarılmış, 1 dk 10 000 devirde santrifüj edilmiş, daha sonra kolonlar yeni tüpe aktarılmıştır.
16. Kolonun üzerine 500 µl Buffer AW1 eklenmiş, 1 dk yüksek devirde santrifüj edilmiş, kolonlar yeni bir tüpe aktarılmıştır.
17. Üzerine 500 µl Buffer AW2 eklenmiş ve 3 dk yüksek hızda santrifüj edilmiştir.
18. Kolonlar yeni bir tüpe aktarılmış ve 1 dk santrifüj edilmiştir.
19. Kolonlar atılıp dipte kalan sıvı başka bir tüpe aktarılmış ve üzerine 200 µl Buffer AE eklenmiş, oda ısısında 1 dk bekletildikten sonra 1 dk santrifüj edilmiştir.
20. Elde edilen DNA ekstraksiyonu -20°C de saklanmıştır.

2.2.4.2. Klasik Yöntemle Dışkı Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

1. Distile su içerisinde stoklanan *Cryptosporidium* ookist izolatu 6 000 devir/10 dk santrifüj edilmiş, süpernatant atılmış, pellet vorteksle

çözölmüş ve pellet -80°C 'de 15 dk dondurulmuştur. Dondurma işleminde sonra oda ısısında çözdürölmüştür. Bu işlem üç kez tekrarlanmıştır.

2. Dondurup çözdürme işleminde sonra pelletin üzerine; 200 µl distile su, 50 µl Tris-HCL (Ph=8,3), 50 µl 0,5 M EDTA, 10 µl 0,5 M NaCl, 10 µl Proteinaz-K, 18,6 µl Dithiothreitol (DTT) eklenmiş ve iyice vortekslenmiştir.
3. Hazırlanan homojenat 65°C 'de 15 dk inkübe edilmiş ve her 5 dakikada bir vortekslenmiştir.
4. Süre sonunda 3 defa fenol+kloroform+izoamil alkol (25: 24: 1) ile muamele edilmiş, bu işleminde ise homojenatın miktarı kadar fenol+kloroform+izoamil alkol eklenmiş, sonra 5 dk çok yavaş hareketlerle ters düz edilerek karıştırma işlemi sonunda 10 000 rpm de 1 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatantın üst kısmı başka bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Aynı uygulama iki defa daha tekrarlanmıştır.
5. Örnek miktarına 10:1 oranında 3M NaAc eklenmiş, toplam hacmin iki katı kadar da etanol eklenmiş ve -20°C 'de 5 gece inkübe edilmiştir.
6. Süre sonunda -20°C 'den alınan örnekler 10 000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş, oluşan supernatant dökölmüş ve pellet kurumaya bırakılmıştır.
7. Pellet 100 µl distile su ile çözülererek üzerine 0,3 M NaAc 'dan (10:1) 10 µl eklenmiş, daha sonra 220 µl etanol ilave edilerek -20°C 'de 1 gece tekrar inkübe edilmiştir.
8. Örnekler -20°C 'den alınarak tekrar 10 000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş, oluşan supernatant dökölmüş ve pellet kurumaya bırakılmıştır.
9. Ekstraksiyon sonucu elde edilen DNA'lar 100 µl distile su ile çözülererek -20°C 'de saklanmıştır (Sambrook ve ark. 1989).

2.2.5. *Cryptosporidium* Türlerinin Belirlenmesi

2.2.5.1. PCR-RFLP, SSU rRNA Gen Amplifikasyonu ve RFLP Analizi

Cryptosporidium izolatlarında (109 örnek) SSU rRNA gen amplifikasyonu için primer (yaklaşık 1400 bp) ve sekonder (yaklaşık 840 bp) PCR olmak üzere iki PCR yöntemi (Nested PCR) uygulanmıştır. Bu yöntemin ilk aşamasında uygulanan primer PCR’da SSU-F2 primer (5’-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3’) ile SSU-R2 primer (5’-CCCATTTCCCTTCGAAACAGGA-3’); ikinci aşamasındaki sekonder PCR’da ise SSU-F3 (5’-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3’) ve SSU-R4 (5’-CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA-3’) primerleri kullanılmıştır. Kontrol için 20 µL’lik PCR ürünü % 1,5 lik agaroz jel de 100-bp DNA marker’ı (DNA ladder) kullanılarak elektroforeze tabi tutulmuş ve PCR ürünü pozitiflik yönünden kontrol edilmiştir (Xiao ve ark. 1999, Jiang ve ark. 2005, Xiao ve Ryan 2008).

1- Primer PCR

a) Her PCR reaksiyonu için hazırlanan 100 µL ana karışım:

10x Perkin-Elmer PCR buffer	10 µL
dNTP (1.25 mM)	16 µL
SSU-F2 primer (40 ng/µL)	2.5 µL
SSU-R2 primer (40 ng/µL)	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	6 µL
Non-acetylated bovine serum albumin (10mg/mL)	4 µL
Distile su	56.5 µL
Taq polimeraz	0.5 µL
Toplam	98 µL

b) Her PCR tüpüne ana karışımdan 98 µL eklendi.

c) Her tüpe DNA süspansiyonundan 2 µL ilave edildi.

d) Aşağıdaki PCR programı uygulandı:

94°C: 3 dk.

35 cycle: 94°C'de 45 sn, 55°C de 45 sn ve 72°C de 1 dk.

72°C de 7 dk.

4°C bekletme (saklama)

2-Sekunder PCR

a) Her PCR reaksiyonu için hazırlanan ana karışım:

10x Perkin-Elmer PCR buffer	10 µL
dNTP (1.25 mM)	16 µL
SSU-F3 primer (40 ng/µL)	5 µL
SSU-R4 primer (40 ng/µL)	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	6 µL
Distile su	55.5 µL
Taq polimeraz	0.5 µL
Toplam	98 µL

b) Her PCR tüpüne ana karışımdan 98 µL eklendi.

c) Her tüpe primer PCR reaksiyonundan 2 µL ilave edildi.

d) Aşağıdaki PCR programı uygulandı:

94°C: 3 dk.

35 cycle: 94°C'de 45 sn, 58°C de 45 sn ve 72°C de 1 dk.

72°C de 7 dk.

4°C bekletme

e) 20 µL'lik PCR ürünü % 1,5' lik agaroz jel de 100-bp DNA marker'ı kullanılarak elektroforeze tabi tutulmuştur (Xiao ve Ryan 2008).

Sekunder PCR ürünlerinin (80 örnek) RFLP ile analizinde MboII restriksiyon enzimi kullanılmıştır.

Kullanılan kesim reaksiyonu;

4 µl MboII enzimi

4 µl 10X MboII enzim tamponu

4 µl PCR ürünleri

28 µl H₂O şeklindedir.

Hazırlanan reaksiyon tüpü 37°C'de 1-16 saat inkübasyona bırakılmıştır ve restriksiyon işleminden sonra elde edilen üründen 40 µL %1,2 lik agaroz jel de 100-bp DNA marker'ı kullanılarak elektroforeze tabi tutulmuştur. *Cryptosporidium* türleri RFLP bant modelleri Tablo 2.4 dikkate alınarak tanımlanmıştır (Feng ve ark. 2007, Xiao ve Ryan 2008).

Tablo 2.4. SSU rRNA geninin RFLP analizi ile sığırlarda bulunan *Cryptosporidium* türlerinin band modelleri

<i>Cryptosporidium</i>	PCR Ürün	<i>Mbo</i> II Ürün
Türü	Büyükük (bp)	(bp)
<i>C. parvum</i>	848	771, 76
<i>C. bovis</i>	836	412, 162, 76
<i>C. ryanae</i>	836	574, 76
<i>C. andersoni</i>	846	769, 76

2.2.5.2. *Cryptosporidium parvum* Subtiplerinin Belirlenmesi (GP60 Geninin PCR ve Sekans Analizi)

Cryptosporidium parvum saptanan izolatlarda (odakları ve çiftlikleri farklı olan, ishalleri ya da sağlıklı buzağular başta olmak üzere farklı yaşlardaki 13 adet sığır dışkı örneği) GP60 gen amplifikasyonu (800–850 bp) yapılmıştır. Bunun için ilk PCR’da GP60-F1 primer (5’-ATAGTCTCCGCTGTATTC-3’) ile GP60-R1 primer (5’-GGAAGGAACGATGTATCT-3’); sekonder PCR’da ise GP60-F2 (5’-TCCGCTGTATTCTCAGCC-3’) ve GP60-R2 (5’-GCAGAGGAACCAGCATC-3’) primerleri kullanılmıştır. PCR sonuçlarının teyit edilmesi için 15 µL’lik sekonder PCR ürünü % 1,5 lik agaroz jel de 100-bp DNA marker’ı kullanılarak elektroforeze tabi tutularak sekonder PCR ürünü tespiti yapılmıştır (Xiao ve Ryan 2008).

1-Primer PCR

a) Her PCR reaksiyonu için hazırlanan ana karışım:

10x Perkin-Elmer PCR buffer	10 µL
dNTP (1.25 mM)	16 µL
GP60-F1 primer (40 ng/µL)	5 µL

GP60-R1 primer (40 ng/ μ L)	5 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	6 μ L
Non-acetylated bovine serum albumin (10mg/mL)	4 μ L
Distile su	51.5 μ L
Taq polimeraz	0.5 μ L
Toplam	98 μL

b) Her PCR tüpüne ana karışımdan 98 μ L eklendi.

c) Her tüpe DNA  rneğinden 2 μ L ilave edildi.

d) Aşağıdaki PCR programı uygulandı:

94°C: 3 dk.

35 cycle: 94°C'de 45 sn, 50°C de 45 sn ve 72°C de 1 dk

72°C de 7 dk

4°C bekletme

2-Sekunder PCR

a) Her PCR reaksiyonu için hazırlanan ana karışım:

10x Perkin-Elmer PCR buffer	10 μ L
dNTP (1.25 mM)	16 μ L
GP60-F2 primer (40 ng/ μ L)	5 μ L
GP60-R2 primer (40 ng/ μ L)	5 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	6 μ L

Distile su	55 µL
Taq polimeraz	0.5 µL
Toplam	97.5 µL

b) Her PCR tüpüne ana karışımdan 97,5 µL eklendi.

c) Her tüpe primer PCR reaksiyonundan 2,5 µL ilave edildi.

d) Aşağıdaki PCR programı uygulandı:

94°C: 3 dk.

35 cycle: 94°C'de 45 sn, 50°C de 45 sn ve 72°C de 1 dk

72°C de 7 dk

4°C bekletme

2.2.5.3. Sekans Analizi (Dizi Analizi)

PCR-RFLP ile *Cryptosporidium* tür teşhisleri yapılan (aynı bp büyüklüğündeki bant modelleri saptanan örneklerde) izolatlarda doğrulama için 24 adet ve *C. parvum* subtiplerinin belirlenmesi için 13 adet olmak üzere toplam 37 adet *Cryptosporidium* izolatının sekans analizi yapılmıştır. Pozitif sekonder PCR ürünü agaroz jel DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak temizlenmiştir. Saflaştırılan PCR ürünü kullanılıncaya kadar -20 °C de saklanmıştır. Temizlenen PCR ürünü; forward ve reverse PCR primerleri ve intermittent (intermediar) primer R3 (5'-GAGATATATCTTGTTGCG-3') kullanılarak sekans analizi yapılmıştır (Xiao ve Ryan 2008).

2.2.5.3.1. DNA Dizi Analizi Reaksiyonu

Dizi analizi reaksiyonu öncesinde parçanın PCR ile çoğaltılması gerekmektedir. PCR reaksiyonuna girecek DNA miktarının büyüklüğüne bağlı olarak

fmol cinsinden hesaplanması yapılmalıdır. Hesaplanan DNA miktarı alınarak hedef bölge PCR reaksiyonunda çoğaltılmıştır.

Dizi analizine girecek DNA'dan gerekli miktarda alınarak dH₂O ile 10 µl hacme tamamlanmıştır (8 µl DTCS ile 2 µl primer). Reaksiyon her bir döngüde 96°C'de 20 saniye, 50°C'de 20 saniye ve 60°C'de 4 dk olacak şekilde 35 döngü olarak devam ettirilmiştir.

2.2.5.3.1.1. Etanol Çöktürmesi

Çalışmada kullanılan (Beckman Coulter DNA Dizi Analizi) DNA dizi analizi cihazına ait dizi analizi kitinin teknik bültenine göre dizi analizine girecek PCR ürünlerinin etanol ile çöktürülüp saflaştırılması yapılmıştır.

Protokole aşağıdaki adımlar ile devam edilmiştir.

1. Durdurma Çözeltisi (Stop Solution) hazırlanır çözeltiden 4'er µl PCR ürünlerine eklenmiş ve 1 µl 20 µg/µl glikojen eklenerek iyice karıştırılmıştır. Stop Solüsyonu: 3 M Sodyum Asetat (pH: 5,2) ile 100 mM Na₂EDTA (pH: 8,0) eşit hacimde karıştırılmasıyla yapılmıştır. Bu karışım kullanmadan hemen önce oda ısısında hazırlanmalıdır.
2. Taze olarak hazırlanmış ve -20°C'de bekletilmiş % 95'lik etanoldan 60 µl pelet hareket ettirilmeden yavaşça eklenmiştir.
3. Tüpler 14.000 rpm'de 4°C'de 15 dakika süre ile santrifüj edilmiş ve dipte oluşan pelet hareket ettirilmeden süpernatant dikkatli şekilde uzaklaştırılmıştır.
4. Pelete 200 µl taze olarak hazırlanmış ve -20°C'de bekletilen %70'lik etanoldan pelet hareket ettirilmeden tüplerin kenarından çok yavaş biçimde bırakılmıştır.

5. Tüpler 14.000 rpm'de 4°C'de 2 dakika süre ile santrifüj edilmiş ve dipte oluşan pellet hareket ettirilmeden süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.
6. Süpernatant dökülmüş, tüp içindeki pelet şeffaf hale gelinceye kadar 40 °C'de 10 dakika süre ile konsantratörde alkol uçurulmuştur.
7. Pellet 40 µl SLS (Sample Loading Solution) eklenmiş ve iyice çözülmüştür. Daha sonra dizi analizi için gerekli özel tablolara yerleştirilmiştir.

2.2.5.3.1.2. DNA Dizi Bilgisinin Elde Edilmesi

Cihazın içinde örnek tablası ve tampon tablası adında iki aparat bulunmaktadır. Örnek tabağına 40 µl SLS içeren örnekler sırasıyla eklenmiş ve üzerlerine kit içinden birer damla mineral yağ damlatılmıştır. Tampon tablasına da yine kit içinden ayırma tamponu, kuyucukların % 70'ini dolduracak kadar eklenmiş ve kapiller aparatı ile jel tüpü cihaza takıldıktan sonra dizi analizi işlemine başlanmıştır.

Dizi analizi, Eskişehir Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde bulunan Beckman Coulter CEQ 8000 8 kapillerli sisteme sahip tam otomatize cihaz ile yapılmıştır. Dizi analiz sonucunda cihaz tarafından okunan veriler bir metin belgesine kaydedilmiştir. Dizi analizi sonucunda elde edilen dizi değişik biyoinformatik programlarla (GeneTool, PepTool ve İnterproscan) ile GenBankasında BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (ALTSCHUL 1990) analiz edilmiştir.

2.2.6. İstatistikî Analiz

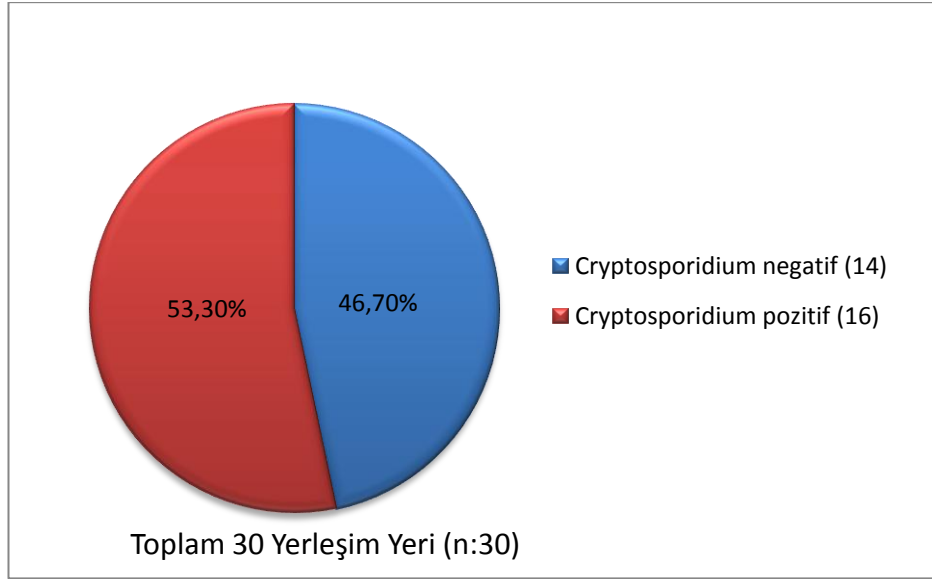
Çalışmadan elde edilen bazı verilerin istatistikî analizinde bilgisayar programında SPSS ve Khi-kare testi kullanılmıştır (SPSS 1999).

3. BULGULAR

3.1. Dağılım Sonuçları

Çalışma bulguları sığırlarda *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı ile ilgili sonuçlar ve *Cryptosporidium* pozitif örneklerden elde edilen izolatların moleküler karakterizasyonunun yapıldığı sonuçlar olmak üzere iki kısımdan oluşmuştur.

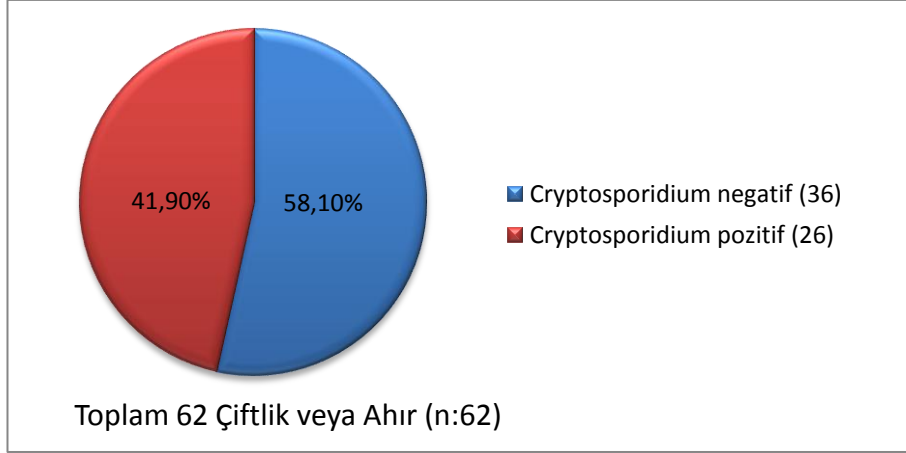
Kars yöresinde *Cryptosporidium* ookistleri materyal alınan yerleşim yerlerinin % 53,3'ünde (16/30) saptanmıştır. Kars ilindeki yerleşim yerlerinde *Cryptosporidium* ookist dağılımı Şekil 3.1'de görülmektedir.



Şekil 3.1. Kars'ta yerleşim yerlerinde *Cryptosporidium* ookistleri görülme oranı

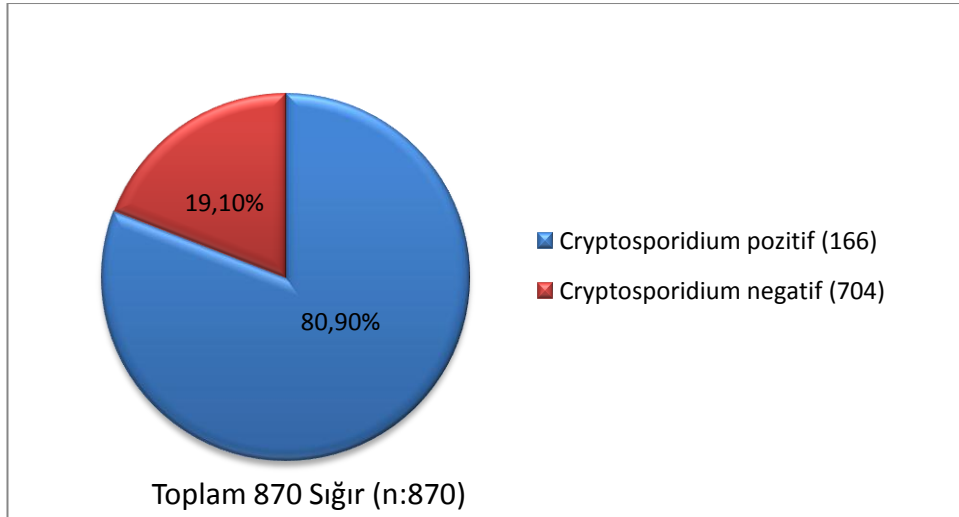
Çalışmanın yapıldığı Kars çevresindeki yerleşim yerlerinde bulunan ve dışkı örneği alınan çiftlik/ahırların % 41,9'unda (26/62) *Cryptosporidium* ookistleri belirlenmiştir.

Kars'ta *Cryptosporidium* türlerinin çiftlik/ahır dağılımı Şekil 3.2'de sunulmuştur.



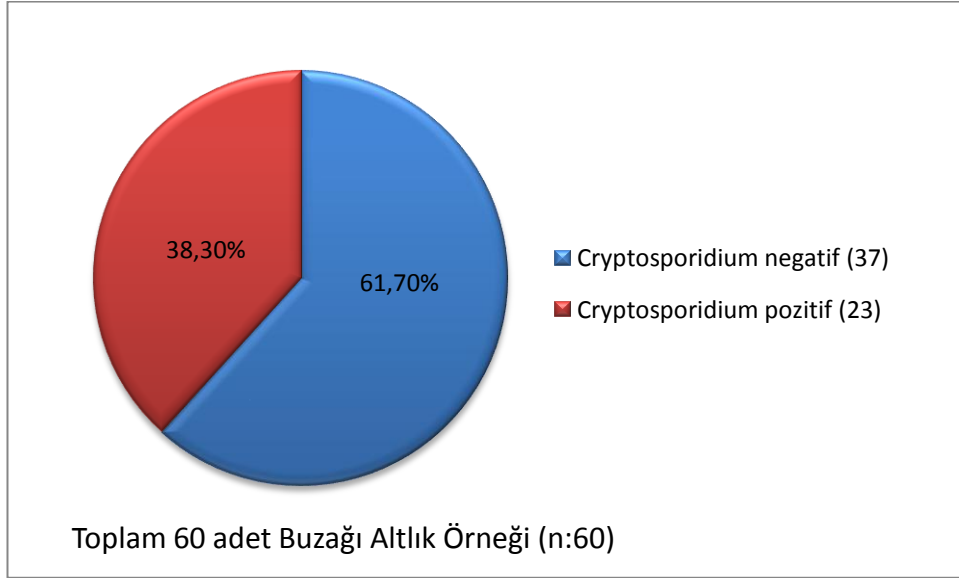
Şekil 3.2. Kars yöresinde sığırlarda *Cryptosporidium* türlerinin çiftlik dağılımı

Araştırmanın yürütüldüğü sığır işletmelerinde dışkı örneği incelenen sığırlarda *Cryptosporidium* türlerinin genel olarak dağılımı % 19,1 (166/870) olarak bulunmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Kars yöresinde sığırlarda *Cryptosporidium* türlerinin genel dağılımı

Çalışmanın yapıldığı çiftliklerde buzağı bölmelerinde altlık örneği alınabilen 60 altlık örneğinin 23'ünde (%38,3) *Cryptosporidium* ookistleri görülmüştür. Buzağı altlık örneğinde *Cryptosporidium* ookisti saptanan bu 23 ahırın tümünde *Cryptosporidium* pozitif bulunmuştur. Kars'taki sığır işletmelerinde buzağı altlık örneklerinde *Cryptosporidium* ookisti görülme oranı Şekil 3.4.'de verilmiştir.



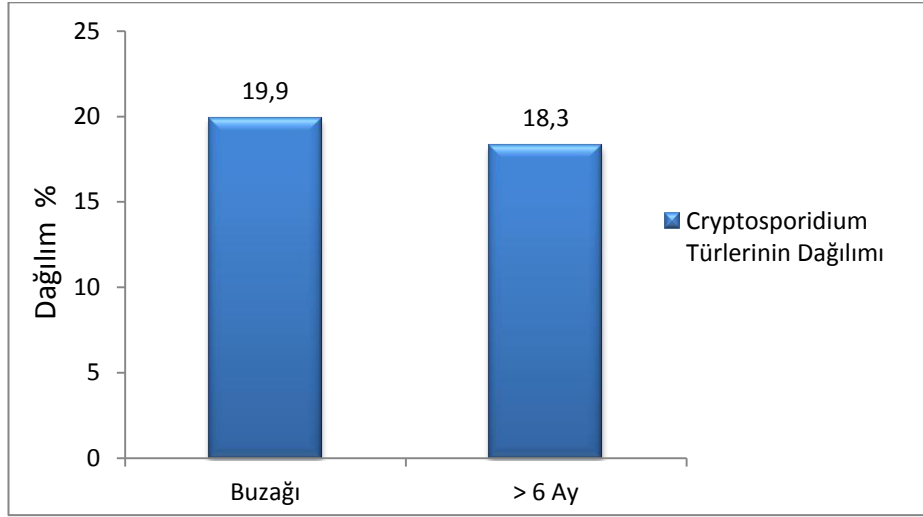
Şekil 3.4. Kars'taki sığır çiftlik/ahırlarında buzağı altlık örneklerinde *Cryptosporidium* ookisti görülme durumu

Kars ilinde sığırlarda *Cryptosporidium* ookistlerinin çiftlik dağılımı, sığırlarda genel yaygınlığı ile buzağı altlık örneklerindeki görülme oranı yerleşim yerlerine göre Tablo 3.1'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Kars yöresinde sığırlarda Modifiye asit fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* ookitlerinin dağılımı

Yerleşim Yeri/Odak	Materyal Alınan Ahır/Çiftlik Sayısı	Ahır/Çiftlikte <i>Cryptosporidium</i> ookitleri durumu	<i>Cryptosporidium</i> saptanan örnek sayısı/İncelenen Örnek Sayısı	Buzağı Altlık Örneği
Cumhuriyet	1	+	12/26	+++
Büyük Aküzüm	1	+	6/6	Alınmamıştır
Boğazköy	1	+	6/33	++
Karakaş	1	+	9/19	+
Başgedikler	1	+	5/10	++
	2	-	0/6	Alınmamıştır
Alaca	1	+	13/18	++
Oğuzlu	1	-	0/21	-
Çağlayan	1	+	6/18	++
Gelirli	1	+	10/21	-
Verimli	1	-	0/14	-
	2	-	0/11	-
	3	-	0/5	-
Dikme	1	+	5/17	+
	2	+	3/12	-
Ataköy	1	-	0/24	-
Azat	1	-	0/22	-
Karakale	1	+	4/32	+
Hacıhalil	1	+	2/20	+
	2	+	4/14	+
Kümbetli	1	+	6/16	+
	2	+	4/8	+
	3	+	7/14	+
	4	-	0/8	-
Başkaya	1	+	4/13	++
	2	+	7/17	+
Aydıncalan	1	+	6/11	+++
	2	+	7/8	+
Akbaba	1	+	6/16	+
	2	+	10/22	++
	3	+	5/7	+
	4	+	5/13	+
Subatan	1	-	0/15	-
	2	-	0/7	-
	3	-	0/17	-
Söğütlü	1	+	8/9	+
	2	+	6/13	+
Benli Ahmet	1	-	0/11	-
	2	-	0/6	-
	3	-	0/18	-
Çakmak	1	-	0/17	-
	2	-	0/21	-
Esenyazı	1	-	0/16	-
	2	-	0/17	-
	3	-	0/8	-
	4	-	0/9	-
	5	-	0/10	-
	6	-	0/6	-
	7	-	0/10	-
Halefoğlu	1	-	0/15	-
Bulanık	1	-	0/25	-
	2	-	0/8	-
Karacaören	1	-	0/16	-
	2	-	0/13	-
Hasçiftlik	1	-	0/9	-
	2	-	0/9	-
	3	-	0/13	-
Karaçoban	1	-	0/13	-
	2	-	0/9	-
Yaylacık	1	-	0/15	-
	2	-	0/6	-
	3	-	0/7	-
Toplam (%)	62	26/62 (%41.9)	166/870 (%19.1)	23/60 (%38.3)

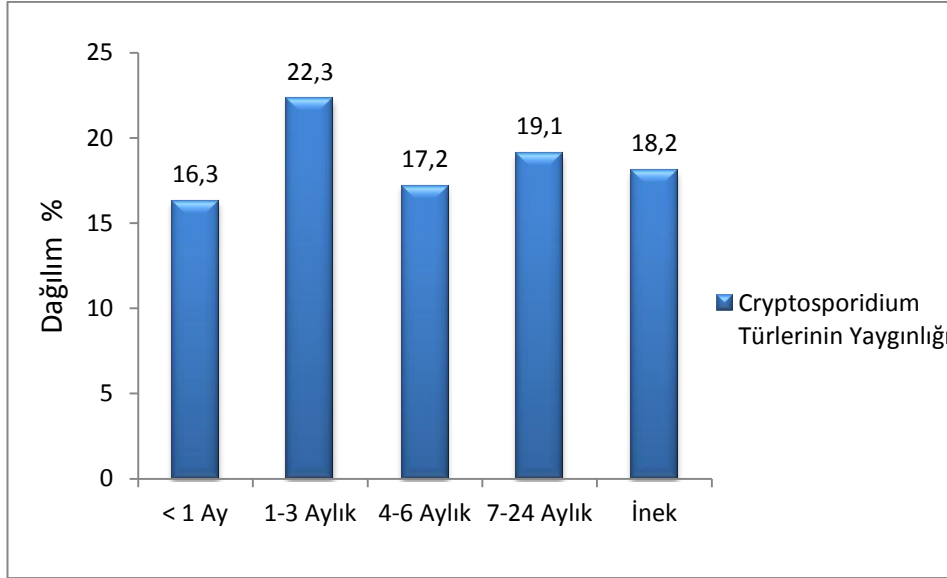
Cryptosporidium türlerinin dağılımı buzağılarda % 19,8 (86/433) olarak bulunmuştur. Bu protozoonun görülme oranı altı aylıktan büyük hayvanlarda % 18,3 (80/437) düzeyinde saptanmıştır. Buzağılarda ve ergin sığırlarda *Cryptosporidium* türlerinin görülme oranı Şekil 3.5 ile Şekil 3.6'da sunulmuştur.



Şekil 3.5. Kars yöresinde buzağılarda ve ergin sığırlarda *Cryptosporidium* türlerinin görülme oranı

Cryptosporidium ookist yaygınlığı 7-24 aylıklarda % 19,1 (13/68) ve ineklerde % 18,2 (67/369) oranlarında belirlenmiştir. *Cryptosporidium* görülme oranı neonatal buzağılarda % 16,3 (25/153), 1-3 aylık ya da süttten kesim öncesi dönemdeki buzağılarda % 22,3 (56/251) ve 4-6 aylık buzağılarda ise % 17,2 (5/29) düzeyinde tespit edilmiştir.

Sığırlarda yaş gruplarına göre *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı Şekil 3.6’ da sunulmuştur.



Şekil 3.6. Kars yöresindeki sığırlarda yaş gruplarına göre *Cryptosporidium* etkenlerinin dağılımı

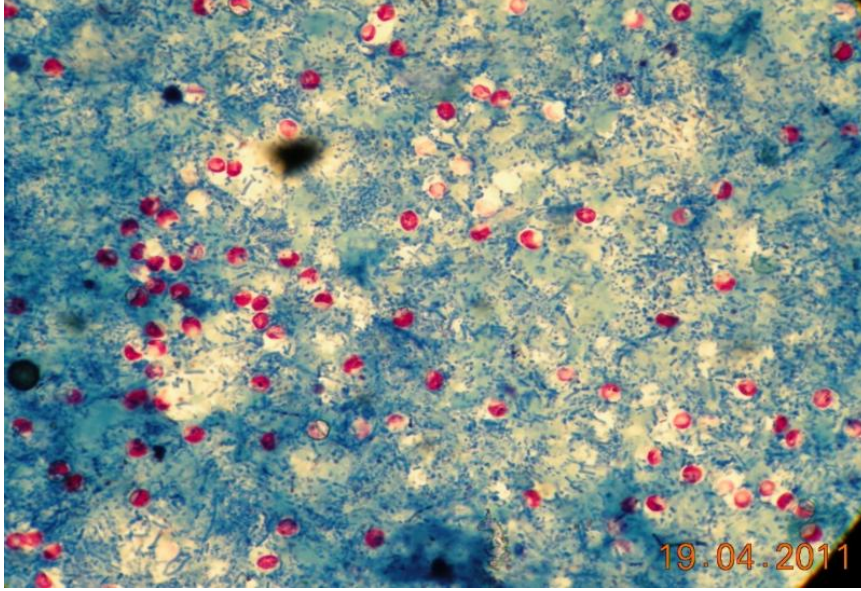
Bu araştırmada Kars çevresindeki sığırlarda yaş grupları ve yerleşim yerlerine göre *Cryptosporidium* oookistlerinin dağılımı ile ilgili veriler Tablo 3.2’ de görölmektedir.

Tablo 3.2. Kars'ta sığırlarda yaş gruplarına göre *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı

Yerleşim Yeri/Odak	<i>Cryptosporidium</i> saptanan örnek sayısı/İncelenen Örnek Sayısı	Buzağılarda <i>Cryptosporidium</i> saptanan örnek sayısı/İncelenen Örnek Sayısı	7 -24 aylık sığırlarda <i>Cryptosporidium</i> saptanan örnek sayısı/İncelenen Örnek Sayısı	İneklerde <i>Cryptosporidium</i> saptanan örnek sayısı/İncelenen Örnek Sayısı
Cumhuriyet	12/26	5/10	1/4	6/12
B. Aküzüm	6/6	6/6	-	-
Boğazköy	6/33	1/9	1/8	4/16
Karakaş	9/19	6/15	-	3/4
Başgedikler	5/16	2/10	2/2	1/4
Alaca	13/18	7/9	1/1	5/8
Oğuzlu	0/21	0/5	0/4	0/12
Çağlayan	6/18	1/8	1/1	4/9
Gelirli	10/21	4/9	0/1	6/12
Verimli	0/30	0/13	0/4	0/13
Dikme	8/29	2/12	0/1	6/16
Ataköy	0/24	0/9	0/2	0/13
Azat	0/22	0/12	-	0/10
Karakale	4/32	1/15	0/2	3/15
Hacıhalil	6/34	4/14	1/6	1/14
Kümbetli	17/46	7/17	2/9	8/20
Başkaya	11/30	7/13	2/4	2/13
Aydıncalan	13/19	5/7	1/1	7/11
Akbaba	26/58	18/31	1/3	7/24
Subatan	0/39	0/24	0/3	0/12
Söğütlü	14/22	10/17	-	4/5
Benli Ahmet	0/35	0/18	0/2	0/15
Çakmak	0/38	0/16	0/6	0/16
Esenyazı	0/76	0/48	0/2	0/26
Halefoğlu	0/15	0/6	-	0/9
Bulanık	0/33	0/18	0/2	0/13
Karacaören	0/29	0/7	-	0/22
Haşçiftlik	0/31	0/22	-	0/9
Karaçoban	0/22	0/20	-	0/2
Yaylacık	0/28	0/13	0/1	0/14
Toplam (%)	166/870(% 19,1)	86/433 (19,9)	13/68 (19,1)	67/369 (18,2)

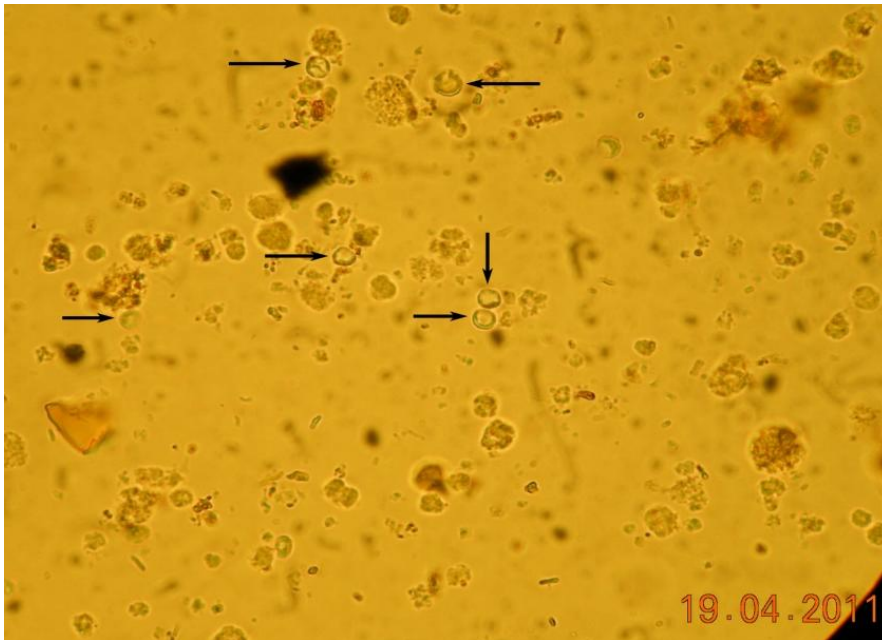
Modifiye asit fast boyama sonuçlarına göre *Cryptosporidium* oookistlerinin ishelli buzağılarda görülme oranı % 19,9 (48/241) olarak belirlenmiştir. Bu oran neonatal ishelli buzağılarda % 15,7 (17/108), 1-3 aylık ishelli buzağılarda % 23,1 (30/130), 4-6 aylık ishelli buzağılarda % 33,3 (1/3) olarak tespit edilmiştir. *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı sağlıklı buzağılarda % 19,8 (38/192), sağlıklı neonatal buzağılarda % 17,8 (8/45), 1-3 aylık sağlıklı buzağılarda % 21,5 (26/121), sağlıklı 4-6 aylık buzağılarda % 15,4 (4/26) olarak belirlenmiştir.

Çalışmada modifiye asit fast boyama yöntemi ile hazırlanan preparatlarda *Cryptosporidium* ookistlerinin mikroskopik görüntüsü Şekil 3.7' de sunulmuştur.



Şekil 3.7. *Cryptosporidium* ookistleri, Modifiye Asit Fast Boyama, x1000

Ayrıca tuzlu su flotasyon yöntemi ile hazırlanan taze preparatlardaki *Cryptosporidium* ookistleri Şekil 3.8' de görülmektedir.



Şekil 3.8. *Cryptosporidium* ookistleri, taze preparat, x1000

Araştırmanın yürütüldüğü Kars yöresindeki çiftliklerde bulunan ve dışkı örneği alınan sığırların klinik durumuna göre *Cryptosporidium* ookistlerinin görülme oranı Tablo 3.3' te verilmiştir.

Tablo 3.3. Sığırların klinik durumuna göre *Cryptosporidium* ookistlerinin görülme oranı

Yaş Grubu	İshalli Hayvan Sayısı		Normal Dışkılı veya Sağlıklı Hayvan Sayısı		Toplam Hayvan Sayısı
	x/n*	%	x/n*	%	x/n*
Buzağı (Altı aylığa kadar)	48/241	19,9	38/192	19,8	86/433
Dana, Düve vs. (7-24 aylık)	-	-	13/68	19,1	13/68
İnek (>24 ay)	-	-	67/369	18,2	67/369

*x/n: *Cryptosporidium* ookisti saptanan hayvan sayısı/ İncelenen Örnek Sayısı

Dışkı örneği incelenen hayvanlarda klinik durum ile mAF boyamada *Cryptosporidium* ookist yoğunluğu arasındaki ilişki incelendiğinde; ookist atılım yoğunluğu ishallerli buzağuların 21'inde (% 8,7) +, 9'unda (% 3,7) ++, 18'inde (% 7,5) ise +++ olarak değerlendirilmiştir. Normal dışkılı olan sağlıklı buzağuların ise 18'inde (% 9,4) +, 6'sinde (% 3,1) ++, 14'ünde (% 7,3) +++ olarak belirlenmiştir. Ayrıca ookist yoğunluğu ineklerin 39'unda (% 10,6) +, 20'sinde (% 5,4) ++, 8'inde (% 2,2) +++ olarak bulunmuştur (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Sığırlarda *Cryptosporidium* ookist atılım yoğunluğunun klinik duruma göre dağılımı.

Ookist Sayısı	Ookist Yoğunluğu	Buzağı (n: 433)		İnek (n: 369)	
		Diyareli (%)	Sağlıklı (%)	Diyareli (%)	Sağlıklı (%)
Ookist yok	-	193/241 (80,1)	154/192 (80,2)	-	302/369 (81,8)
1-10 ookist	+	21/241 (8,7)	18/192 (9,4)	-	39/369 (10,6)
11-25 ookist	++	9/241 (3,7)	6/192 (3,1)	-	20/369 (5,4)
>25 ookist	+++	18/241 (7,5)	14/192 (7,3)	-	8/369 (2,2)
Toplam		48/241 (19,9)	38/192 (19,8)	-	67/369 (18,2)

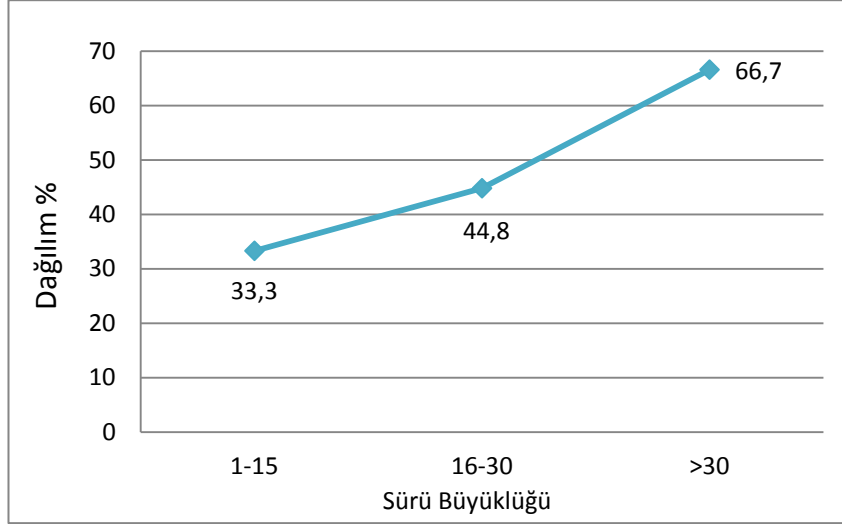
Çalışmanın yürütüldüğü 62 çiftlikte bulunan hayvan sayıları yani sürü büyüklüğüne göre *Cryptosporidium* ookist dağılımı arasındaki ilişki Tablo 3.5’de sunulmuştur. *Cryptosporidium* görülme oranı sürü büyüklüğünün 1-15 olduğu işletmelerde % 33,3 olduğu halde, çiftlikteki hayvan sayısı 30’ün üzerinde olan barınaklarda bu oran % 66,7 olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.5). Ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli ($\chi^2=2.43$) bulunmamıştır ($P>0.005$).

Tablo 3.5. Kars yöresindeki sığır işletmelerinde sürü büyüklüğüne göre *Cryptosporidium* ookistlerinin dağılımı

Sürü Büyüklüğü	Çiftlik/Ahır Sayısı	x/n	%
1-15	27	9/27	33,3
16-30	29	13/29	44,8
>30	6	4/6	66,7
Toplam	62	26/62	

x/n: *Cryptosporidium* Saptanan Çiftlik Sayısı/Çiftlik Sayısı

Bu sığır işletmelerinde bulunan buzağı, dana, düve ve inek gibi toplam hayvan sayısına göre *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı değişiklik göstermiştir. Araştırmada sürü büyüklüğü yani bir ahır veya çiftlikteki hayvan sayısı arttıkça *Cryptosporidium* türlerinin görülme oranının da arttığı görülmüştür (Şekil 3.9).



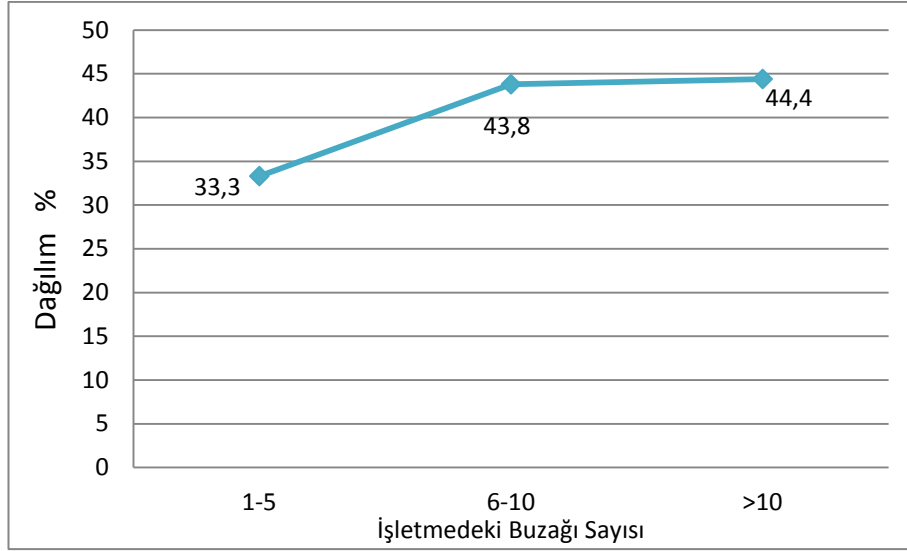
Şekil 3.9. Kars yöresindeki sığır işletmelerinde sürü büyüklüğüne göre *Cryptosporidium* oookistlerinin dağılımı (Sürü Büyüklüğü: Bir ahır veya çiftlikteki toplam hayvan sayısı)

Dışkı örneği alınan çiftliklerdeki buzağı sayısına göre *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı Tablo 3.6 ve Şekil 3.10' da verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi çiftliklerdeki buzağı sayısı arttıkça *Cryptosporidium* türlerinin dağılımında artmaktadır. Buzağı sayısının 10'dan fazla olduğu çiftliklerde *Cryptosporidium* türlerinin yaygınlığı % 44,4 olarak gözlenmiştir. Ancak bu fark istatistiki olarak önemli ($\chi^2=0.646$) bulunmamıştır ($P>0.005$).

Tablo 3.6. Kars yöresindeki sığır işletmelerinde buzağı sayısına göre *Cryptosporidium* oookistlerinin dağılımı

Buzağı Sayısı	Çiftlik Sayısı	x/n	%
1-5	21	7/21	33,3
6-10	32	14/32	43,8
>10	9	4/9	44,4
Toplam	62	25/62	

x/n: *Cryptosporidium* Saptanan Çiftlik Sayısı/Çiftlik Sayısı



Şekil 3.10. Kars yöresindeki sığır işletmelerinde buzağı sayısına göre *Cryptosporidium* oookistlerinin dağılımı

3.2. Moleküler Karakterizasyon Sonuçları

Çalışmada; mAF boyama yöntemi ile 2010 yılında incelemesi yapılan 870 sığır dışkı örneğinden (430 buzağı, 440 yaşlı hayvan) 110, 2011 yılında 419 dışkı örneğinden (285 buzağı, 134 ergin sığır) 19'u *Cryptosporidium* pozitif olarak değerlendirilmiş ve toplam (– 20'de saklanan) 129 dışkı örneği kullanılmıştır.

Bu 129 örneğin 109'undan (% 84,5) genomik DNA (total DNA) elde edilmiştir. Bu örneklerin ve elde edilen genomik DNA sayılarının yaş ve klinik duruma göre dağılımı Tablo 3.7'de sunulmuştur.

Tablo 3.7'de görüldüğü gibi gaita örneklerinde dışkı kiti (DNA stool kit) veya klasik yöntem ile DNA ekstraksiyonu yapılan buzağuların % 85,3 (64/75), ergin sığırların % 83,3 (45/54)' ünden genomik DNA elde edilmiştir. Ayrıca mAF boyama tekniği ile *Cryptosporidium* pozitif kabul edilen ishallerli buzağularda % 83,0 (39/47) ve sağlıklı buzağularda % 89,3 (25/28) oranında genomik DNA saptanmıştır. Bu çalışma için materyal sağlanan 21 çiftlik veya köyün 20'sinde genomik DNA saptanmıştır. Sadece bir odakta genomik DNA elde edilmemiştir.

Tablo 3.7. Çalışmada incelenen *Cryptosporidium* izolatları ve bunlardan elde edilen genomik DNA sayıları.

Yerleşim Yeri (Odak)	Hayvanın Yaşı ve Klinik Durumu			Genomik DNA Elde edilen Örnek Sayısı		
	İshalli	Sağlıklı	Ergin	İshalli	Sağlıklı	Ergin
	Buzağı (3 gün–ay)	Buzağı (3 gün–3ay)	sığır (>1 yaş)	Buzağı (3 gün–3ay)	Buzağı (3 gün–3 ay)	sığır (>1 yaş)
Akbaba	10	5	8	8	5	7
Alaca	3	0	0	2	0	0
Aydıncalan	2	2	6	2	1	4
Büyükaküzüm	4	1	0	4	1	0
Başgedikler	3	0	2	3	0	2
Başkaya	0	4	3	0	4	3
Boğazköy	2	1	3	2	1	3
Cumhuriyet	5	0	6	2	0	4
Çağlayan	1	2	2	1	2	1
Dikme	0	2	6	0	2	5
Gelirli	2	1	2	2	1	2
Hacıhalil	0	1	1	0	1	1
Karakale	1	0	2	1	0	2
Karakaş	2	1	0	1	1	0
Kocabahçe	1	0	0	1	0	0
Kümbetli	3	5	12	3	4	10
Söğütlü-Arpaçay	3	2	1	3	2	1
Subatan	1	1	0	0	0	0
Söğütlü-M Klinik	1	0	0	1	0	0
Yaylacık-Klinik	2	0	0	2	0	0
Hasçiftlik-Klinik	1	0	0	1	0	0
Toplam	47	28	54	39	25	45

Genomik DNA saptanan 109 *Cryptosporidium* izolatının SSU rRNA gen amplifikasyonu Nested PCR yöntemi ile yapılmış olup, bu örneklerin 80'inde (% 73,4) *Cryptosporidium* türleri yönünden pozitif olan sekonder PCR ürünü elde edilmiştir.

Bu çalışmada genomik DNA saptanan buzağuların % 78,1 (50/64), ergin sığırların % 66,7 (30/45)' sinde SSU rRNA gen amplifikasyonu sonucu *Cryptosporidium* pozitif PCR ürünü elde edilmiştir. Ayrıca genomik DNA saptanan izolatlarda *Cryptosporidium* pozitif PCR ürünü görülme oranı; ishallerli buzağularda % 92,3 (36/39) ve sağlıklı buzağularda % 56,0 (14/25) oranında saptanmıştır. *Cryptosporidium* türleri yönünden pozitif olan PCR ürünleri en yüksek (% 92,3) düzeyde diyareli buzağulardan elde edilmiştir (Tablo 3.8).

Tablo 3.8'de de görüleceği üzere araştırmada genomik DNA elde edilen 20 yerleşim yerinin tümünde *Cryptosporidium* pozitif PCR ürünü saptanmıştır. Kars çevresindeki çiftlik, köy ahır ve kliniklerdeki sığırlardan elde edilen *Cryptosporidium* izolatlarının SSU rRNA gen amplifikasyonu sonucu *Cryptosporidium* türleri yönünden pozitif olan örneklerin yerleşim yerleri ve hayvan özelliklerine göre dağılımı Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8. *Cryptosporidium* isolatlarının SSU rRNA gen amplifikasyonu sonucu *Cryptosporidium* türleri yönünden pozitif olan sekonder PCR ürünlerinin dağılımı

Yerleşim Yeri (Odak)	Genomik DNA Elde Edilen Örnek Sayısı			<i>Cryptosporidium</i> Pozitif PCR Ürünü Sayısı		
	İshalli	Sağlıklı	Ergin	İshalli	Sağlıklı	Ergin
	Buzağı (3 gün-ay)	Buzağı (3 gün-ay)	sığır (>1yaş)	Buzağı (3 gün-3 ay)	Buzağı (3 gün-ay)	sığır (>1 yaş)
Akbaba	8	5	7	7	3	3
Alaca	2	0	0	2	0	0
Aydıncalan	2	1	4	2	0	3
Büyükaküzüm	4	1	0	4	1	0
Başgedikler	3	0	2	3	0	2
Başkaya	0	4	3	0	2	2
Boğazköy	2	1	3	2	0	1
Cumhuriyet	2	0	4	2	0	3
Çağlayan	1	2	1	1	1	0
Dikme	0	2	5	0	0	5
Gelirli	2	1	2	2	1	2
Hacıhalil	0	1	1	0	1	1
Karakale	1	0	2	0	0	2
Karakaş	1	1	0	1	0	0
Kocabahçe	1	0	0	1	0	0
Kümbetli	3	4	10	2	3	5
Söğütlü-M-Arpaçay	3	2	1	3	2	1
Söğütlü-Klinik	1	0	0	1	0	0
Yaylacık-Klinik	2	0	0	2	0	0
Hasçiftlik-Klinik	1	0	0	1	0	0
Toplam	39	25	45	36	14	30

Çalışma başlangıcında mAF boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* pozitif kabul edilen 129 dışkı örneğinin 80'inde (% 62,0) SSU rRNA gen amplifikasyonu sonucu pozitif PCR ürünü elde edilmiştir. Ayrıca mAF boyama ile *Cryptosporidium* oookistleri yönünden pozitif sayılan 21 çiftliğin 20'sinde PCR ile *Cryptosporidium* türleri saptanmıştır. *Cryptosporidium* pozitif PCR ürünlerinin mAF boyama sonuçları ile karşılaştırması Tablo 3.9' da sunulmuştur.

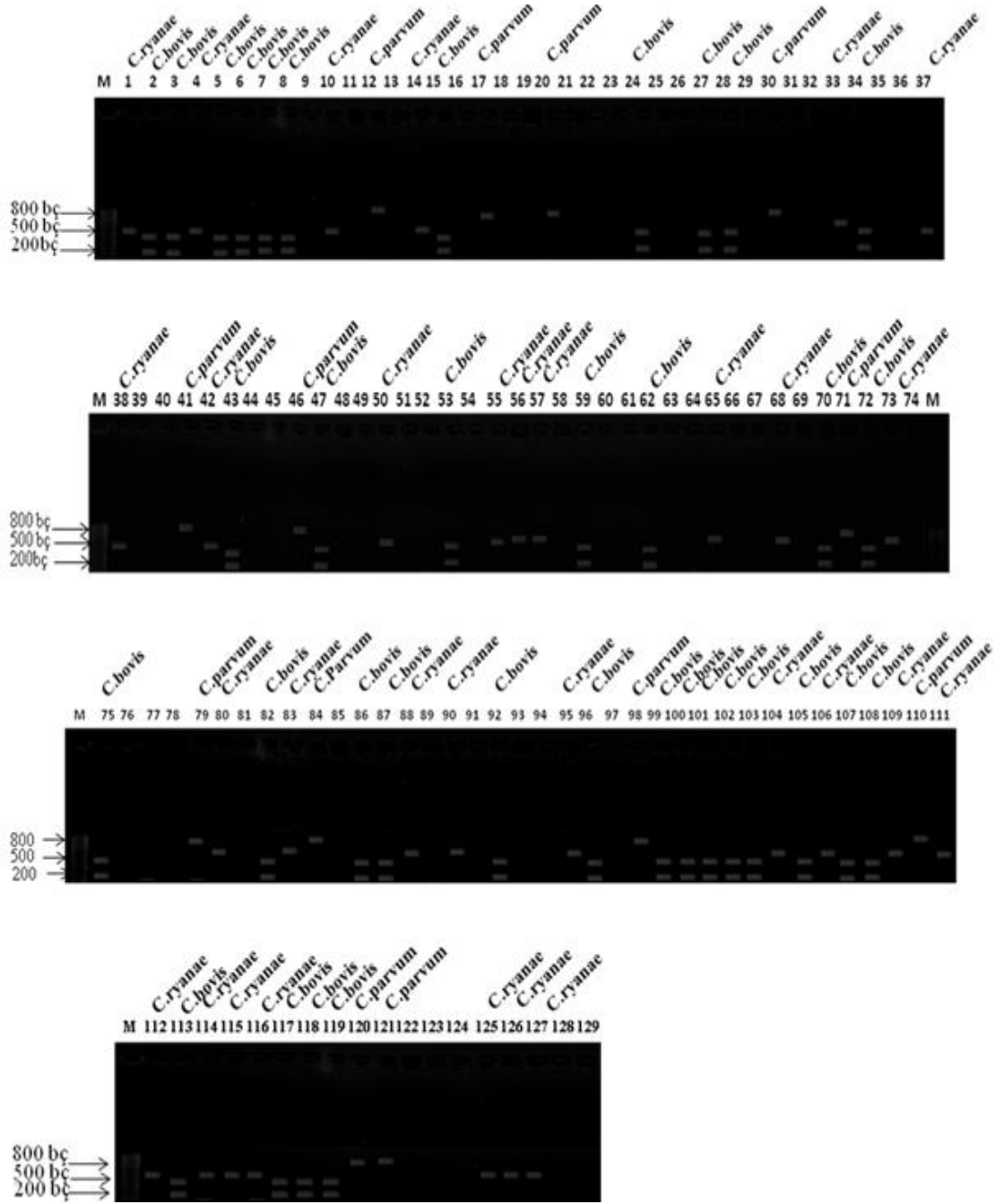
Tablo 3.9. *Cryptosporidium* türlerinin görülme oranının mAF boyama yöntemi ve PCR ürünü sonuçlarına göre karşılaştırılması.

Yerleşim Yeri (Odak)	mAF boyama ile <i>Cryptosporidium</i> pozitif izolat sayıları			<i>Cryptosporidium</i> saptanan PCR Ürünü Sayısı		
	İshalli	Sağlıklı	Ergin	İshalli	Sağlıklı	Ergin
	Buzağı (3 gün-ay)	Buzağı (3 gün-ay)	sığır (>1 yaş)	Buzağı (3 gün-ay)	Buzağı (3 gün-3 ay)	sığır (>1 yaş)
Akbaba	10	5	8	7	3	3
Alaca	3	0	0	2	0	0
Aydıncalan	2	2	6	2	0	3
Büyükaküzüm	4	1	0	4	1	0
Başgedikler	3	0	2	3	0	2
Başkaya	0	4	3	0	2	2
Boğazköy	2	1	3	2	0	1
Cumhuriyet	5	0	6	2	0	3
Çağlayan	1	2	2	1	1	0
Dikme	0	2	6	0	0	5
Gelirli	2	1	2	2	1	2
Hacıhalil	0	1	1	0	1	1
Karakale	1	0	2	0	0	2
Karakaş	2	1	0	1	0	0
Kocabahçe	1	0	0	1	0	0
Kümbetli	3	5	12	2	3	5
Söğütlü-Arpaçay	3	2	1	3	2	1
Subatan	1	1	0	0	0	0
Söğütlü-M-Klinik	1	0	0	1	0	0
Yaylacık-Klinik	2	0	0	2	0	0
Hasçiftlik-Klinik	1	0	0	1	0	0
Toplam	47	28	54	36	14	30

Tablo 3.9’da görüldüğü gibi yaş grupları ve klinik duruma göre karşılaştırıldığında mAF boyama ile *Cryptosporidium* pozitif olan izolatlardaki elde edilen PCR ürünü görülme sıklığı; ishallerli buzağılarda % 76,6 (36/47), sağlıklı buzağılarda % 50,0 (14/28), yaşlılarda ise % 55,6 (30/54) olarak bulunmuştur. İshallerli buzağılardan elde edilen izolatlardan PCR ürünü saptanma oranının diğer yaş gruplarına göre daha yüksek düzeyde olduğu görülmüştür (Tablo 3.9).

Bu çalışmada Kars yöresindeki sığırlardan elde edilen ve *Cryptosporidium* etkenleri yönünden pozitif olan 36 adet diyareli buzağı, 14 adet sağlıklı buzağı ve 30 adet bir yaş üzere sığır olmak üzere toplam 80 adet örneğe ait PCR-RFLP sonuçları Şekil 3.11’de görülmektedir. *Cryptosporidium* pozitif PCR ürünlerinin RFLP analizi sonucu elde edilen amplifikasyonlar *C. parvum*, *C. bovis* ve *C. ryanae* olduğu görülmüştür (Şekil 3.11).

Ayrıca bu şekilde çalışmada kullanılan ve moleküler karakterizasyonu yapılan toplam 129 örneğe ait tüm agaroz jel görüntüleri de izlenebilir. Agaroz jel görüntülerinde 129 örneğin 80’inde bant görüntüleri vardır, 49 örnekte ise herhangi bir bant şekillenmemiştir. Bu 49 örnek *Cryptosporidium* türleri yönünden negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. *Cryptosporidium* türlerine ait PCR-RFLP jel görüntüleri. PCR ürünlerinin MboII enzimi ile restriksiyon analizinin agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp marker, (1–119 kesim ürünleri % 0,8'lik agaroz jel'e 3µl 100 bp marker ile birlikte yüklenmiş ve 90 V'de 50 dk yürütülmüştür).

Buzağı ve erişkin sığırda bulunan *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı ile ilgili veriler Tablo 3.10’da sunulmuştur. Bu tablodan da izleneceği üzere Kars yöresindeki buzağı ve daha ileri ergin sığırda PCR-RFLP ile üç farklı *Cryptosporidium* türü saptanmıştır. Belirlenen bu türler *C. parvum*, *C. bovis* ve *C. ryanae*’dir. Saptanan bu üç tür hem buzağılarda hem de ergin sığırda bulunmuştur.

Tablo 3.10. Kars yöresinde PCR-RFLP ile sığırda klinik ve yaş durumuna göre *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı

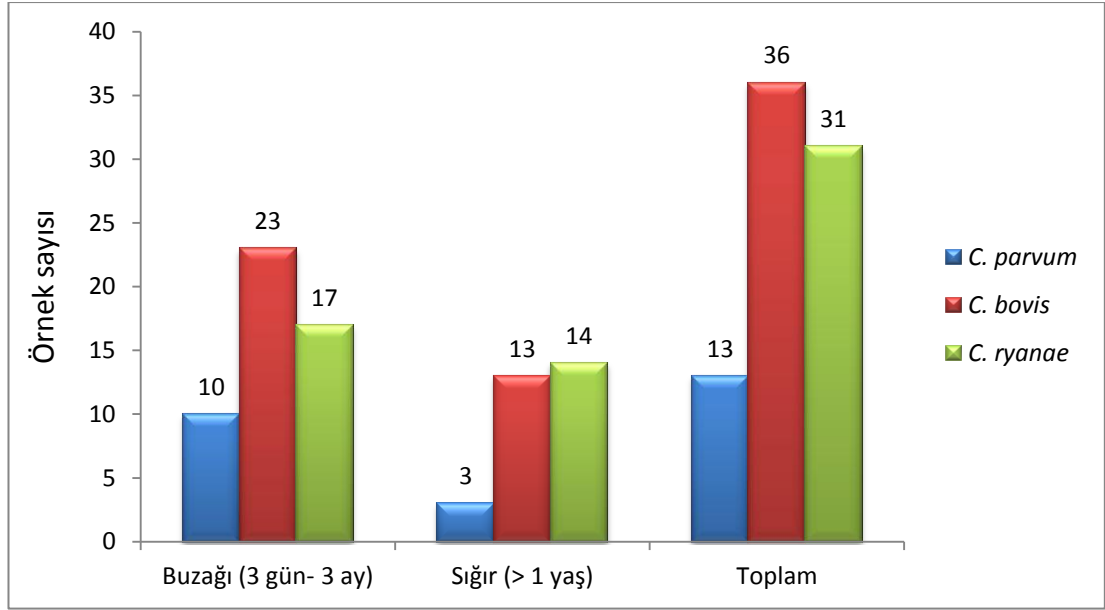
Yerleşim Yeri (Odak)	<i>C. parvum</i>			<i>C. bovis</i>			<i>C. ryanae</i>		
	İşhalli Buzağı	Sağlıklı Buzağı	Ergin Sığır	İşhalli Buzağı	Sağlıklı Buzağı	Ergin Sığır	İşhalli Buzağı	Sağlıklı Buzağı	Ergin Sığır
Akbaba	1	1	1	3	2	1	3	0	1
Alaca	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Aydınalan	1	0	0	1	0	0	0	0	3
Büyükaküzüm	0	0	0	3	1	0	1	0	0
Başgedikler	1	0	0	2	0	0	0	0	2
Başkaya	0	0	0	0	0	1	0	2	1
Boğazköy	0	0	0	1	0	1	1	0	0
Cumhuriyet	0	0	0	1	0	1	1	0	2
Çağlayan	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Dikme	0	0	1	0	0	4	0	0	0
Gelirli	0	0	0	2	0	1	0	1	1
Hacıhalil	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Karakale	0	0	1	0	0	1	0	0	0
Karakaş	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Kocabahçe	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Kümbetli	1	1	0	0	2	1	1	0	4
Söğütlü-Arpaçay	0	0	0	1	1	1	2	1	0
Söğütlü-M-Klinik	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Yaylacık-Klinik	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Haşçiftlik-Klinik	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Toplam	8	2	3	15	8	13	13	4	14

Bu çalışmada PCR-RFLP ile sığırlarda saptanan *Cryptosporidium* türlerinin görülme oranı; *C. parvum* % 16,3 (13/80), *C. bovis* % 45,0 (36/80) ve *C. ryanae* % 38,8 (31/80) olarak belirlenmiştir. Bu türlerin buzağı ve erişkin sığırlardaki dağılımı Tablo 3.11 ve Şekil 3.12’de görülmektedir.

Tablo 3.11. Sığırlarda PCR-RFLP sonuçlarına göre *Cryptosporidium* türlerinin yaş gruplarına göre dağılımı.

Tür	Buzağı (3 gün–3 aylık)	Sığır (>1 yaş)	Toplam
<i>Cryptosporidium parvum</i>	10 (% 20,0)	3 (% 10,0)	13 (% 16,3)
<i>Cryptosporidium bovis</i>	23 (% 46,0)	13 (% 43,3)	36 (% 45,0)
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	17 (% 34,0)	14 (% 46,7)	31 (% 38,8)
Toplam	50	30	80

Tablo 3.11’ dende izleneceği gibi Kars yöresindeki sığırlarda *C. bovis* en yaygın (% 45,0) görülen tür olmuştur. Bunu *C. ryanae* ve *C. parvum* takip etmiştir. Buzağılarda ise ergin sığırlara göre *C. parvum* türü daha yaygın olarak saptanmıştır. Ayrıca *C. ryanae* türü buzağılara göre ergin sığırlarda daha yüksek oranlarda gözlenmiştir.



Şekil 3.12. Sığırlarda PCR-RFLP ile *Cryptosporidium* türlerinin yaş gruplarına göre dağılımı.

Yaş gruplarına ilaveten klinik olarak ishal veya normal dışkı (sağlıklı) kriteri dikkate alınarak yapılan değerlendirme sonuçları Tablo 3.12’de özetlenmiştir.

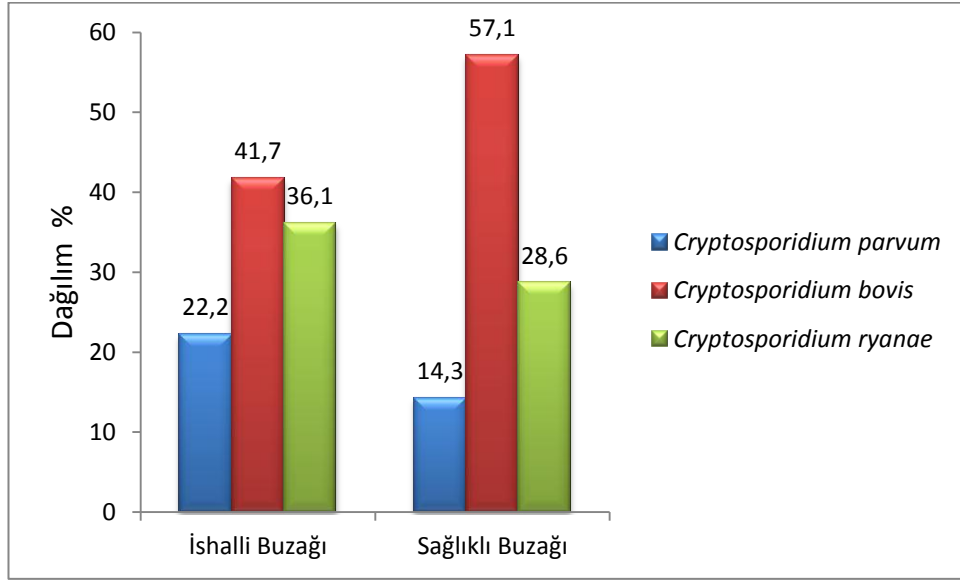
Tablo 3.12. Sığırlarda PCR-RFLP ile saptanan *Cryptosporidium* türlerinin hayvanların klinik durumuna göre dağılımı

<i>Cryptosporidium</i> Türü	Buzağı (3 gün–3 aylık)		Ergin Sığır (>1 yaş) (%)	Toplam
	İshalli (%)	Sağlıklı (%)		
	<i>C. parvum</i>	8 (22,2)	2 (14,3)	3 (10,0)
<i>C. bovis</i>	15 (41,7)	8 (57,1)	13 (43,3)	36
<i>C. ryanae</i>	13 (36,1)	4 (28,6)	14 (46,7)	31
Toplam	36	14	30	80

Klinik olarak diyareli buzağılarda *C. parvum* daha yüksek oranda görülmüştür. *Cryptosporidium parvum* ishallerde % 22,2, normal dışkı olan sağlıklı buzağılarda ise % 14,3 oranında saptanmıştır. İneklere ise *C. parvum*

görülme sıklığı daha düşük oaranda (% 10,0) bulunmuştur. Yaş gruplarına göre *Cryptosporidium* türlerinin dağılımına bakıldığında; *C. parvum*'un ishallerde (% 22,2), *C. bovis*'in sağlıklı buzağlarda (% 57,1) ve *C. ryanae*'nin ergin sığırlarda (% 46,7) daha yaygın olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.12.).

Çalışmada ishaller ve sağlıklı buzağlarda *Cryptosporidium* türlerinin yaygınlığı Şekil 3.13'de sunulmuştur.



Şekil 3.13. Buzağlarda PCR-RFLP ile saptanan *Cryptosporidium* türlerinin klinik durumuna göre dağılımı

Kars yöresindeki sığırlarda PCR ürünü elde edilen 80 örneğin 13'ünde (% 16,2) *C. parvum* saptanmıştır. *Cryptosporidium parvum* materyal alınan odak/yerleşim yerlerinin % 42,9 (9/21)'inde görülmüştür. Diğer önemli bir bulguda *C. parvum* saptanan hayvanların çoğunlukla buzağı (% 76,9; 10/13) ve ishaller (% 80,0; 8/10) olmalarıdır. Ayrıca *C. parvum* türü ile enfekte bu hayvanların dışkıları ile daha fazla ookist atıkları (% 46,2; 6/10) belirlenmiştir. *Cryptosporidium parvum* saptanan hayvanlarda mAF boyama ile yapılan ookist yoğunluğu skorlamasının; +++ (% 46,2; 6/13), ++ (% 30,8; 4/13) ve + (% 23,1; 3/13) olduğu saptanmıştır (Tablo 3.13).

Klinik olarak diyareli buzağılarda *C. parvum* daha yaygın (8/13) görülmüştür. *Cryptosporidium parvum* belirlenen buzağuların genellikle bir aylık civarı oldukları, en genç yaşta olanın beş günlük olduğu kaydedilmiştir. Çalışmadaki bir yaş üzeri sığırların bulunduğu yaş grubunda ise *C. parvum* saptanan hayvanların 5–8 yaşlarındaki ineklerin olduğu görülmüştür.

Kars ve çevresindeki sığırlardan PCR-RFLP ile saptanan *C. parvum* örnekleri ile bunlara ait ayrıntılı özellikler Tablo 3.13’de verilmiştir.

Tablo 3.13. Kars çevresindeki sığırlarda saptanan *Cryptosporidium parvum* örneklerinin dağılımı.

Odak-Protokol No	PCR No	Yaş	Klinik Durumu	mAF Boyama Ookist Yoğunluğu	<i>Cryptosporidium</i> Türü
Aydıncalan-2	17	Buzağı (2 Ay)	İshalli	+++	<i>C. parvum</i>
Çağlayan-4	41	Buzağı (1 Ay)	İshalli	+	<i>C. parvum</i>
Akbaba-17	46	Buzağı (20 Gün)	İshalli	+++	<i>C. parvum</i>
Söğütlü-M-K70	71	Buzağı (5 Gün)	İshalli	+++	<i>C. parvum</i>
Kümbetli-40	79	Buzağı (1 Ay)	İshalli	+	<i>C. parvum</i>
Başgedikler-14	84	Buzağı (1 Ay)	İshalli	+	<i>C. parvum</i>
Alaca-4	120	Buzağı (20 gün)	İshalli	+++	<i>C. parvum</i>
Alaca-7	121	Buzağı (1.5 Ay)	İshalli	+++	<i>C. parvum</i>
Kümbetli-30	12	Buzağı (3 Ay)	Sağlıklı	++	<i>C. parvum</i>
Akbaba-30	110	Buzağı (2 Ay)	Sağlıklı	+++	<i>C. parvum</i>
Karakale-17	20	İnek (8 Yaş)	Sağlıklı	++	<i>C. parvum</i>
Akbaba-16	30	İnek (10 Yaş)	Sağlıklı	++	<i>C. parvum</i>
Dikme-16	98	İnek (5 Yaş)	Sağlıklı	++	<i>C. parvum</i>

Kars yöresindeki buzağı ve sığırlarda PCR ile teşhisi yapılan 13 *C. parvum* örneğinin subtiplendirilmesi yapılmış olup, bu örneklerin GP60 gen amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürününün yapılan sekans analizi sonucu IIa ve IIc subtip

famlyaları saptanmıştır. Sekans analizi yapılan *C. parvum* örneklerinin 12'sinde Ila (12/13) ve birinde ise IId (1/13) subtip famlyası tespit edilmiştir. Bu subtip famlyalarına bağlı olarak IlaA15G2R1 (10/13), IlaA16G3R1 (2/13) ve IIdA15G1 (1/13) subtipleri/subgenotipleri bulunmuştur.

Cryptosporidium parvum'un Ila subtip famlyasına bağlı olarak 10 subtip, IId famlyasına ait ise bir subtip belirlenmiştir. Kars yoresindeki sığırlarda en sık görülen subtipin IlaA15G2R1 (10/13) olduğu gözlenmiştir. Klinik olarak diyareli buzağılarda da IlaA15G2R1 (7/8) subtip/subgenotipi daha yaygın olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.14).

Tablo 3.14. Kars çevresindeki sığırlarda saptanan *Cryptosporidium parvum* subtiplerinin dağılımı.

Odak-Protokol No	Yaş-Klinik Durum	<i>C. parvum</i> subtip famlyası	<i>C. parvum</i> subtip/subgenotip	Genbank No
Aydınalan-2	İshalli Buzağı (2 Ay)	Ila	IlaA16G3R1	AB560739.1
Çağlayan-4	İshalli Buzağı (1 Ay)	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
Akbaba-17	İshalli Buzağı (20 Gün)	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
Söğütlü-M-K70	İshalli Buzağı (5 Gün)	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
Kümbetli-40	İshalli Buzağı (1 Ay)	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
Başgedikler-14	İshalli Buzağı (1 Ay)	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
Alaca-4	İshalli Buzağı (20 gün)	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
Alaca-7	İshalli Buzağı (1.5 Ay)	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
Kümbetli-30	Sağlıklı Buzağı (3 Ay)	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
Akbaba-30	Sağlıklı Buzağı (2 Ay)	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
Karakale-17	Sağlıklı İnek (8 Yaş)	IId	IIdA15G1	AB560740.1
Akbaba-16	Sağlıklı İnek (10 Yaş)	Ila	IlaA15G2R1	AB560741.1
Dikme-16	Sağlıklı İnek (5 Yaş)	Ila	IlaA16G3R1	AB560739.1

Tablo 3.14’de de izleneceği gibi, Kars çevresindeki sığırlarda ve özellikle ishali buzağlarda *C. parvum*’un zoonotik subtip familyası olan Ila daha sıklıkla (12/13) görülmüş olup, bu familyaya bağlı olan IlaA15G2R1 de zoonotik potansiyeli olan subtip olması açısından bu çalışma bulguları yönünden önemlidir.

Çalışmada Kars yöresindeki sığırlarda (buzağı ve inek) tespit edilen *Cryptosporidium* türleri ile bu türlerden olan *Cryptosporidium parvum*’un subtiplerine ait dizi analizi bilgileri Şekil 3.14-18’de belirtilmiştir.

Gen Bank No:**DQ991389.2**

Cryptosporidium bovis 18S ribosomal RNA gene

ATGCATGTCTAAGTATAAGCTTTTATACAGCTAAACTGCGAATGGCTCATTATAACAGTT
 ATAGTTTACTTGATAATCTTTACACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATG
 CGAAAAAACCCGACTTCTTGAAGGGTGTATTTATTAGATAAAGAACCAATATTTTTGG
 TGACTCATAATAACTTTACGGATCACATTATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATC
 AGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGGGTAACGGGGAATTAGGG
 TTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGGC
 CGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGAACCT
 TACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAACAAGTATCAATTGGAGGG
 CAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTG
 CAGTAAAAAGCTCGTAGTTAATCTTCTGTTAATTTTTATATATAATATCTYGATRTTTAT
 ATAATATTAARATAATTCATATTACTTTTTAGTATATGAACTTTACTTTGAGAAAATTAG
 AGTGCTTAAAGCAGGCTATTGCCTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGGATTTTT
 ATTCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAATGATGATTAATAGGAACAGTTGGGGGCATTTG
 TATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTAAAGACAA

Şekil 3.14. *Cryptosporidium bovis*’e ait dizi analizi

Gen Bank No: **AB513679.1**

Cryptosporidium ryanae gene for 18S ribosomal RNA

AGATAAAGAACCAATATTTTTGGTGACTCATAATAACTTTACGGATCACACTATGTGACA
 TATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTAT
 GACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA
 CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGAC
 AAGAAATAACAATACAGAGCCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCC
 TTAACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCA
 ATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTTCTGTTAATTTTTA
 TATAAATGCTACGGTATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTTTTTAGTATATGA
 AACTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTATTGCCTGAATACTCCAGCA
 TGAATAATATTAAGGATTTTTATTCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAATAATGATTAAT
 AGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTAA
 GACAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTATTAAATCAAGAACGAAAGTTA
 GGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCTAGTCTTAACCATAAACT

Şekil 3.15. *Cryptosporidium ryanae*’ya ait dizi analizi

Gen Bank No: **AB560741.1**

Cryptosporidium parvum

GGAAC TTTAAAGGATG TTCCTGTTGAGGGCTCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCATCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAAGCTGG
GAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCTAGTGGTACTGAAGCTTCTGCTAGCCAGGGTTC
TGAAGAGGAAGGAAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCTGCTTCCCAACCCACTACTC
CAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAAGAATGC
GGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGT
GCCTACACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCA

Şekil 3.16. *Cryptosporidium parvum* IIaA15G2R1 subtipine ait dizi analizi

Gen Bank No: **AB560739.1**

Cryptosporidium parvum

GAGGAAC TTTAAAGGATG TTCCTGTTGAGGGCTCATCATCGTCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCAACATCATCATCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAA
GAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCTAGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGC
CAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCTGCTTCCCAACC
CACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAG
AAGAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGA
AGTGTGGTGCCTACACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAA

Şekil 3.17. *Cryptosporidium parvum* IIaA16G3R1 subtipine ait dizi analizi

Gen Bank No: **AB560740.1**

Cryptosporidium parvum

CACTTTAAAGGATG TTTCTGTTGAGGGTTCATCATCATCATCATCATCATCATCATCGTCA
TCATCATCATCATCATCATCGACTGTAGCACCAACTCCAAAGAAAGAAAGAACTGGAGA
GGAAGTAGCTAATCCAGGTTCTGAAGGTCAGGACGGTAAAGGAGACACTGAAGAAACA
GAAGACAATCAGACCGAGAGTACTGTTTCTCAAATACTCCAGCTCAAACCTGAAGGCAC
AACTACCGAAACCACAGAAGCTGCTCAAAGAAAGAGTGCGGTAATTCATTTGTTATGTG
GTTTCGGAGAGGGTGTTCAGTTGCATCTTTGAAGTGTGGCGACTATACTATGGTCTATGC
ACCAGAAAAGGACAAAACAGATCCCGCACCAA

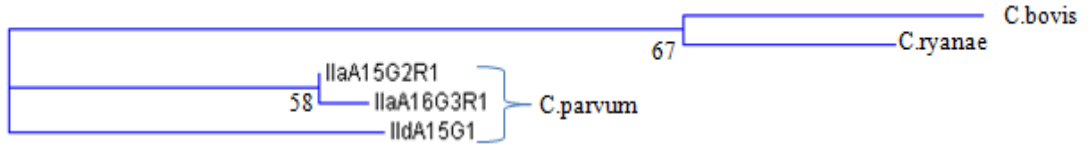
Şekil 3.18. *Cryptosporidium parvum* IIaA15G1 subtipine ait dizi analizi

Dizi analizi sonucu elde edilen diziler NCBI veri tabanında bulunan BLAST analizine göre, *C. bovis* olarak belirlenen dizi % 99 oranında *C. bovis* 18S ribosomal RNA genine (DQ991389.2) ve *C. ryanae* olarak belirlenen dizi % 99 oranında *C. bovis* 18S ribosomal RNA genine (AB513679.1) benzerlik göstermektedir. Ayrıca *C. parvum* olarak belirlenen diziler % 99 oranında sırasıyla *C. parvum* IIAA15G2R1 subtipine (AB560741.1), *C. parvum* IIAA16G3R1 subtipine (AB560744.1) ve *C. parvum* IIAA15G1 subtipine (AB560740.1) benzerlik göstermektedir.

Cryptosporidium türlerinin evrimsel yakınlığını belirlemek için hizalama sonucu elde edilen verinin cluster algoritması ve ile seç-bağla (bootstrap) yöntemi 1000 tekrarlı kullanılarak Şekil 3.20'de görülen filogenetik ağacı oluşturulmuştur. Ağaç analizinde de görüldüğü gibi; *C.bovis* ile *C.ryanae*'nin yakınlık gösterdiği, *C.parvum* subtiplerinde kendi aralarında yakınlık gösterdiği belirlenmiştir.

C.parvum I Ia15G2R1	-----GGAACCTT-----TAAAGGA----TGTTCCCTGT	23
C.parvum I Ia16G3R1	-----GAGGAACCTT-----TAAAGGA----TGTTCCCTGT	25
C.parvum I Id15G1	-----CACTT-----TAAAGGA----TGTTCCCTGT	21
C.bovis	CGAAAAAACCCGACTTCTTGGAGGGTTGTATTATTAGATAAAGAACCAATATTTTTGG	180
C.ryanae	-----AGATAAAGAACCAATATTTTTGG	23
C.parvum I Ia15G2R1	TGAGGGCTCATCATCGTCATCGTCATCATCATCAT---CATCATCAT-CA-----TCA	72
C.parvum I Ia16G3R1	TGAGGGCTCATCATCGTCATCGTCATCGTCATCAT---CATCATCAT-CAACATCATCA	80
C.parvum I Id15G1	TGAGGGTTCATCATCATCATCATCATCATCAT---CGTCATCAT-CA-----	67
C.bovis	TGA---CTCATAATAACTTTACGGATCA-CATTATGTGACAT-ATCATTCAAGTTTCTGA	235
C.ryanae	TGA---CTCATAATAACTTTACGGATCA-CATTATGTGACAT-ATCATTCAAGTTTCTGA	78
C.parvum I Ia15G2R1	TC-ATCATCAACA-----TCAACCGTCGC---AC---CAGC---AAAT	105
C.parvum I Ia16G3R1	TC-ATCATCAACA-----TCAACCGTCGC---AC---CAGC---AAAT	113
C.parvum I Id15G1	TC-ATCATCATCA-----FCGACTGTAGC---AC---CAACTCCAAG	103
C.bovis	CCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGGGTAACGGGGAAT	295
C.ryanae	CCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGGGTAACGGGGAAT	138
C.parvum I Ia15G2R1	AAGG-----CAAGAACTGG-GAAG-----ACGCAGAA	131
C.parvum I Ia16G3R1	AAGG-----CAAGAACTGGAGAAG-----ACGCAGAA	140
C.parvum I Id15G1	AAAG-----AAAGAACTGGAGAGG-----A---ACTA	127
C.bovis	TAGGGTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCA	355
C.ryanae	TAGGGTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCA	198
C.parvum I Ia15G2R1	GGC-----AGT---CAAGATTCAGT-----GGTA----CTGAAGCTTCTGTAGCCAG	173
C.parvum I Ia16G3R1	GGC-----AGT---CAAGATTCAGT-----GGTA----CTGAAGCTTCTGTAGCCAG	182
C.parvum I Id15G1	GCT-----AAT---CCAGGTTCAGAA-----GGT-----CAGCA-----CGTTAAAGCA	163
C.bovis	GGCCGCGCAAAATACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGAA	415
C.ryanae	GGCCGCGCAAAATACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGAG	258
C.parvum I Ia15G2R1	-----GGTCTGAA---GAGGAAGGAAGTGA-AGAC-----GAT--G-GCCAA-----	209
C.parvum I Ia16G3R1	-----GGTCTGAA---GAGGAAGGTAGTGA-AGAC-----GAT--G-GCCAA-----	218
C.parvum I Id15G1	-----GACACTGAA---GAAACAG-----A-AGAC-----AATCAG-ACCAG-----	195
C.bovis	CCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCTTAACAAGTATCAATTGGA	475
C.ryanae	CCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCTTAACAAGTATCAATTGGA	318
C.parvum I Ia15G2R1	--ACTAGTGTCTCTCC--CAACC-CACTA-CTCCAGCTCAAA-----GTGAAGGC-	254
C.parvum I Ia16G3R1	--ACTAGTGTCTCTCC--CAACC-CACTA-CTCCAGCTCAAA-----GTGAAGGC-	263
C.parvum I Id15G1	--G--AGTACTGTTTCT--CAA---AATA-CTCCAGCTCAAA-----CTGAAGGC-	235
C.bovis	GGGCAAGT-CTGGTCCAGCAGCCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTT	534
C.ryanae	GGGCAAGT-CTGGTCCAGCAGCCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTT	377
C.parvum I Ia15G2R1	---GCAACTACCGAAACCATAG--AAGCTACT-CCAA-----AAGAAGAATG---CGGCA	300
C.parvum I Ia16G3R1	---GCAACTACCGAAACCATAG--AAGCTACT-CCAA-----AAGAAGAATG---CGGCA	309
C.parvum I Id15G1	---ACAACTACCGAAACCACAG--AAGCTGCT-CCAA-----AGAAGAGTG---CGGTA	284
C.bovis	GTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATCTCTGTTAATTTTTATATAATAATCTYGAATR	591
C.ryanae	GTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATCTCTGTTAATTTTTATATAACAATGCTACGGTA	437
C.parvum I Ia15G2R1	CTT-----CAT-----TTGTAATGTG-----	316
C.parvum I Ia16G3R1	CTT-----CAT-----TTGTAATGTG-----	325
C.parvum I Id15G1	CTT-----CAT-----TTGTAATGTG-----	297
C.bovis	TTTATATAATATAAARATAATTCATATTAATTTTAGTATATGAAACTTTACTTTGAGAA	654
C.ryanae	TTTATATAATATAAARATAATTCATATTAATTTTAGTATATGAAACTTTACTTTGAGAA	497
C.parvum I Ia15G2R1	-----GTTCCGAGAAGG-----TACCCAGC-TG---CGACATTGAAG	350
C.parvum I Ia16G3R1	-----GTTCCGAGAAGG-----TACCCAGC-TG---CGACATTGAAG	359
C.parvum I Id15G1	-----GTTCCGAGAGGG-----TGTTCCAGT-TG---CATCTTTGAAG	331
C.bovis	AATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGG	714
C.ryanae	AATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGG	557
C.parvum I Ia15G2R1	-----FGTGGTGCTTACACTA-----TCGTCTAT-----G	375
C.parvum I Ia16G3R1	-----FGTGGTGCTTACACTA-----TCGTCTAT-----G	384
C.parvum I Id15G1	-----TGTGGCCTACTACTA-----TCGTCTAT-----G	356
C.bovis	ATTTTATTTCTTCTTATTGGTTCTAGAAATAAAATGATGATTAATAGGAACAGTTGGGGG	774
C.ryanae	ATTTTATTTCTTCTTATTGGTTCTAGAAATAAAATGATGATTAATAGGAACAGTTGGGGG	617
C.parvum I Ia15G2R1	CACCTATA-----AAAGACCAAAC---AGATCCCGCA-----	404
C.parvum I Ia16G3R1	CACCTATA-----AAAGACCAAAC---AGATCCCGCA-----	417
C.parvum I Id15G1	CACCAGAA-----AAGGACAAAAC---AGATCCCGCAC---CAA-----	389
C.bovis	CATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAGACAA-----	824
C.ryanae	CATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTACTGCGA	677

Şekil 3.19. *Cryptosporidium* izolatlarına ait karşılaştırılma hizalama sonuçları.



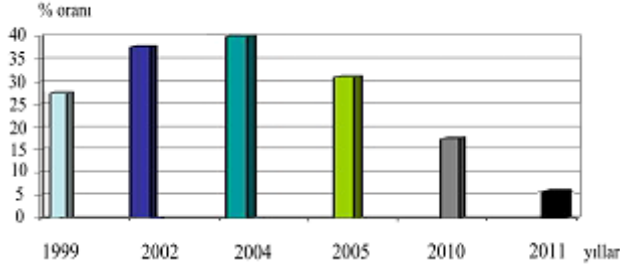
Şekil 3.20. *Cryptosporidium* izolatlarına ait filogenetik ağaç analizi (1000 tekrarlı bootstrap ile oluşturulmuş ve Neighbor-joining yöntemi ile çalışan ClustalW ve MEGA4 programları kullanılmıştır).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sığır yetiştiriciliği tüm dünyada hayvancılık sektörü içinde önemli bir yere sahiptir. İnsanlarda kırmızı et ihtiyacının karşılanmasında sığır ilk sıralarda gelmektedir. Bu durum Türkiye açısından daha belirgindir. Çünkü Türkiye’de alışkanlıklar nedeniyle de kırmızı et ve özellikle de sığır eti çok tercih edilmektedir. Sığır yetiştiriciliğinde en temel kriter sürü geleceğinin sağlanması, sürü popülasyonunun korunması ve işletmenin sürdürülebilir olmasıdır. Bir sığır işletmesinde devamlılığı sağlamak için damızlık hayvan ve bunlardan elde edilen sağlıklı buzağı önemlidir. Bir işletmedeki sağlıklı buzağı sayısı ve buzağı kaybının asgariye indirilmesi ekonomik yönden dikkat edilmesi gereken hususlardır. Sağlıklı buzağı; doğumu takiben buzağuların ilk birkaç gün ile neonatal dönemde ve altı ayağa kadarki sürede hastalıklardan korunan buzağı demektir. Enfeksiyon etkenlerinden bakteriyel, viral ve paraziter etkenlere bağlı hastalıklar buzağularda görülmektedir. Klinik olarak diyare buzağularda en yaygın olarak karşılaşılan semptomların başında gelmektedir. Buzağı ishallerinde *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Clostridium* sp., rotavirus, coronavirus, parvovirus, *Eimeria* sp. enfeksiyöz ajanlar olup, buzağı ishallerinde *Cryptosporidium* etkenleri önemli bir yer tutmaktadır. Buzağularda diyare etiyolojilerinde paraziter etkenlerden olan *Cryptosporidium* enfeksiyonları ilk sıralarda gelmektedir. Özellikle neonatal ishelli buzağularda *Cryptosporidium* türleri birinci sırada yer almaktadır. Bu nedenle cryptosporidiosis bağlı buzağı verim kayıpları ve buzağı kayıpları katma değer yönünden önemlidir (Çitil ve ark. 2004, O’handley ve Olson 2006, Del Coco ve ark. 2008).

Kars yöresinde 1999–2005 yıllarında, 7 yıllık süredeki 4 dönemlik periyotta (1999, 2002, 2004, 2005) ishelli buzağularda cryptosporidiosis prevalansı: 1999’da % 25,7 (36/140), 2002’de % 37,7 (40/106), 2004’de % 40,0 (72/180) ve 2005’de % 31,1 (23/74) olarak saptanmıştır. Kars çevresinde 1999-2005 yıllarındaki genel yaygınlık oranı % 34,2 (171/500) olarak bulunmuştur. Kars yöresinde ishelli buzağularda *Cryptosporidium* ookisti görülme oranı 2010’da % 17,5 (62/354),

2011’de ise % 5,6 (13/233)’lara kadar düştüğü gözlenmiştir Arslan ve ark. 2001, Arslan 2005, Arslan ve ark. 2011) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Kars yöresindeki buzağılarda *Cryptosporidium* prevalansı

Cryptosporidium prevalansında yıllara göre farklılıklar görülmektedir. Kars çevresinde bunu etkileyen faktörler arasında yetiştirme tarzı, besleme biçimi, çiftlik gelişmişlik durumu, modern ve hijyenik işletmelerin ortaya çıkması sayılabilir. Ayrıca yetiştiricilerde veteriner hekimlik hizmetleri sonucu oluşan eğitim düzeyinde önemli olduğu tahmin edilmektedir. Tüm bunların yanında en önemli etkinin iklim değişikliklerinden olabileceği düşünülmüştür. Bu sebeple Kars Meteorolojik Bölge Müdürlüğü’nden alınan meteorolojik veriler yorumlanmıştır. *Cryptosporidium* yaygınlığında sıcaklık ve yağış miktarının oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Tablo 12’den de görüleceği üzere 2011 yılı Mart ayı sıcaklık ortalaması $-1,7^{\circ}\text{C}$ ve yağış miktarı ise $12,2 \text{ mm/cm}^2$ ile en düşük düzeyde olmuştur. Ayrıca 1999–2011 yılı Mart ayı sıcaklık ortalaması genellikle (-) lerde iken, 2004’de $1,2^{\circ}\text{C}$ kaydedilmiştir. Yine 2004 yılı Mayıs ayı toplam yağış miktarı $152,2 \text{ mm/cm}^2$ ile en yüksek olarak gözlenmiştir (Anon 2011).

Tablo 4.1. Kars'ta diyareli buzağılarda *Cryptosporidium* görülme oranlarının sıcaklık ve yağış durumu ile karşılaştırılması*

	1999	2002	2004	2005	2010	2011
<i>Cryptosporidium</i>	25.7	37.7	40.0	31.1	17.5	5.6
% yaygınlık	(36/140)	(40/106)	(72/180)	(23/74)	(62/354)	(13/233)
Mart						
Ortalama Sıcaklık (°C)	-0.4	0.9	1.2	-1.5	1.6	-1.7
Mart						
Toplam Yağış Miktarı	40.8	45.7	29.7	46.1	54.6	12.2
Nisan						
Toplam Yağış Miktarı	50.5	119.1	91.9	81.6	69.0	95.6
Mayıs						
Toplam Yağış Miktarı	41.6	72.0	152.2	97.8	95.1	97.0
Bahar Mevsimi	132.9	236.8	275.6	225.5	218.7	204.8
Toplam Yağış Miktarı (mm/cm²)						

*Kars Meteoroloji Bölge Müdürlüğü'nden alınmıştır.

Kars yöresinde Kış mevsiminde kar yağışının fazla olması, Mart ayı başlangıcında ise sıcaklığın yüksek olması ya da ani ısınma nedeniyle oluşan sel olayları buzağılarda cryptosporidiosis olgularının daha yaygın görülmesine neden olmaktadır. Ayrıca Nisan-Mayıs aylarının yağmurlu geçmesi ve bu aylarda yağış miktarının fazla olması da buzağılarda *Cryptosporidium* yaygınlığını arttıran ikinci önemli faktör olmaktadır (Tablo 4.1). İlkbahar aylarında ahırlardaki buzağı sayısının fazla olması, ahırların çatılarının toprak olması ve ahır çevresindeki yağmur suyu birikintileri ve hayvanların içme sularına bu yağmur sularının karışması ve altlıkların çamur haline gelmesi cryptosporidiosis salgınlarının görülmesinde etkili olabilecek risk faktörleridir. Cryptosporidiosis epidemiyolojisinde ahır tipi, ahırdaki hayvan sayısı, buzağuların anneleri ile aynı ortamı paylaşmaları, buzağuların yaş gruplarına göre farklı bölmelere alınmaması, işletme tipi ve içme suyu etkilidir. *Cryptosporidium* enfeksiyonlarına sütçü işletmelerde daha yaygın olarak rastlanmaktadır (Starkey ve ark. 2006, Thompson ve ark. 2005, Nichols 2008, Silverlas ve ark. 2009). Kars ili Türkiye'nin Kuzey Doğusunda bulunan 1600–1800 rakımlı alanda bulunan ve oldukça soğuk ve uzun süren kış dönemi görülen, yaz

aylarında mera hayvancılığının yapıldığı coğrafi alandır. Sığır yetiştiriciliğinde ortalama 50 hayvan sayısının olduğu ahır ve çiftliklerin sayısı artmaktadır. Yetiştiricilik genellikle sütçü işletme tarzında yapılmaktadır. Bu nedenle hemen hemen her işletmede buzağı bulunmaktadır. Bakım, besleme özellikleri ile genel hijyen durumları ve çiftlik yönetimi birbirine oldukça benzer özellikler taşımaktadır.

Sığırlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarına *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* ve *C. andersoni* türleri neden olmaktadır. Bu türlerden *C. parvum* dünyada en yaygın olanıdır. Hem buzağılarda ciddi boyutlarda hastalığa neden olması, hemde insanlardaki cryptosporidiosis olgularında *C. parvum*'un % 45'ler düzeyinde görülmesi bu türün önemini ortaya koymaktadır (Fayer 2010, Xiao ve ark. 2004). *Cryptosporidium parvum*'un buzağılarda daha sık görülmesi ve zoonotik olması son 30 yıldır araştırmaların genç hayvanlarda yapılmasına vesile olmuştur. Buzağılar doğum sonrası 3–5 gün sonra dışkıları ile fazla sayıda ookist atmaya başlarlar. Klinik enfeksiyonlarda buzağılarda belirgin olarak görülmektedir. Özellikle neonatal buzağılar insanlara kontaminasyonlarda ve salgınlarda etkili olabilecek hayvanlardır (Coklin ve ark. 2007, Fayer 2008, Santin ve Trout 2008, Tzipori ve Ward 2002, O'handley ve Olson 2006). Cryptosporidiosisli buzağılar dışkıları ile daha fazla ookist çıkarırlar. İshalli buzağılarda ookist atılımı daha da artmaktadır. Özellikle süt kesim öncesi yani iki aylığa kadar olan buzağılar *Cryptosporidium* ookist bulaşmasında önemli rol oynarlar (Uga ve ark. 2000, Geurden ve ark. 2006, Kvac ve ark. 2006, Singh ve ark. 2006, Thompson ve ark. 2007, Keshavarz ve ark. 2009).

Hayvan ve insanlarda bulunan *Cryptosporidium* türlerini belirlemek için rutin boyama yöntemlerinden moleküler tekniklere kadar değişen yöntemler teşhiste kullanılmaktadır. Parazitoloji'de dışkı muayenelerinde rutin teknik olan boyama metodu asit-fast boyalardır. Modifiye asit fast metodu (mAF) ile hazırlanan preparatlarda ookistler görülerek tanı konulmaktadır (Ok ve ark. 1997). Ancak bu teknikle sadece cins düzeyinde *Cryptosporidium* etkenleri belirlenmektedir. Ayrıca mavi zemin üzerinde yuvarlak, oval ve küresel şekilde 4–7 µm büyüklüğünde içlerinde sporozoitleri olan ookistleri görmekle tanı konulmaktadır. Preparat incelemede mayalar başta olmak üzere diğer bazı pseudoparazitler ile de bu ookistler

karıştırılabilmektedir. Tanıda bu kriter her zaman göz önünde bulundurulmalıdır. Her ne kadar bazı çalışmalarda (Kvac ve ark. 2006) ookist büyüklüklerine göre tür ayrımları yapılmışsa da bu yöntemin çok sağlıklı olmayacağı açıktır. Ayrıca taze/ıslak preparatlarda ortalama 5 µm büyüklüğündeki ookistin ayrımının yapılması oldukça deneyim gerektiren bir konu olacağı gibi genellikle de yanlış sonuçlar vermektedir. Aysul ve ark. (2009), ishalleri buzağı dışkılarında Modifiye Kinyoun's Asit-Fast yöntemi ile pozitif olarak değerlendirdikleri bir örnekte PCR ile negatif bulmuşlardır. Yapılan bu çalışmada mAF boyama ile pozitif olarak değerlendirilen 129 örneğin 80'inde (% 62,0) PCR ile *Cryptosporidium* pozitif bulunmuştur. Ancak ishalleri buzağılarda bu oran % 76,6 (36/47) ile daha yüksek bulunmuştur. Sağlıklı ya da ergin sığırlara ait dışkı örneklerinde bu oran % 50'lere kadar düşmektedir. PCR tekniklerinin daha duyarlı olduğu (Sungur ve ark. 2008) dikkate alındığında boyama yöntemleri ile pozitif olan dışkı örneklerinde PCR ile negatif ise o zaman mikroskopik tanıda sorun olabileceği düşünülmelidir.

Bu çalışmada Kars bölgesinde *Cryptosporidium* türlerinin modifiye asit fast boyama metodu (mAF) ile dağılımı belirlenmiştir. Modifiye asit fast boyama metodu sonuçlarına göre çalışmanın yapıldığı 30 odaktan 16'sında (%53,3) *Cryptosporidium* türleri tespit edilmiştir. Dışkı örneği alınan 62 çiftlik/ahırların ise 26'sında (%41,9) *Cryptosporidium* ookistleri saptanmıştır. Çalışmanın yapıldığı bu sığır işletmelerdeki *Cryptosporidium* türlerinin genel dağılımı % 19,1 (166/870) olarak görülmüştür. Bu oran Estonya'da % 30 (281/928) (Lassen ve ark. 2009) ve Nijerya'da % 23 (95/406) (Ayinmode ve Fagbemi 2010) düzeyinde bulunmuştur. Buzağı altlık örneği alınabilen 60 çiftliğin 23'ünde (% 38,3) *Cryptosporidium* ookistleri tespit edilmiştir. Buzağı altlık örnekleri pozitif olan bu çiftlik/ahırların tümünün *Cryptosporidium* pozitif olduğu görülmüştür. *Cryptosporidium* türlerinin dağılımının buzağılarda %19,9 (86/433), altı aylıktan büyük hayvanlarda ise % 18,3 (80/437) düzeyinde olduğu saptanmıştır.

Modifiye asit fast boyama ile neonatal buzağılarda % 16,3 (25/153), 1-3 aylık ya da süttan kesim öncesi dönemdeki buzağılarda % 22,3 (56/251) ve 4-6 aylık buzağılarda ise % 17,2 (5/29) düzeyinde *Cryptosporidium* ookistleri tespit edilmiştir.

Ayrıca ookist görülme oranı 7-24 aylıklarda % 19,1 (13/68) ineklerde % 18,2 (67/369) olarak belirlenmiştir. Estonya’da üç aydan küçük buzağılarda % 24, 3-12 aylık genç sığırlarda % 29 ve 12 aydan büyük sığırlarda % 37 oranında saptanmıştır (Lassen ve ark. 2009). Nijerya’da altı aydan küçük buzağılarda % 27, 7-12 aylık genç sığırlarda % 28, 12 aydan büyük sığırlarda % 19 olarak belirlenmiştir (Ayinmode ve Fagbemi 2010). İsveç’te sütçü sığırlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları iki aylığa kadar olan buzağılarda % 52, 4-12 aylık genç sığırlarda % 29 ve ineklerde % 5,6 oranında görülmüştür (Silverlas ve ark. 2009). Kars bölgesinde yapılan bu çalışma sütçü işletmelerde doğum sezonunda yapıldığı için inekler genellikle periparturient dönemde bulunmaktadırlar. Buda *Cryptosporidium* yaygınlığının özellikle ineklerde yüksek olmasına sebep olmaktadır. Kars’ta *Cryptosporidium* türlerinin yaygınlığı periparturient dönendeki ineklerde % 7,2 olarak tespit edilirken, periparturient dışı kontrol gurubunda ise % 4,8 olarak tespit edilmiştir (Arslan ve ark. 2012).

Çalışmada *Cryptosporidium* ookistleri ishali buzağılarda % 19,9 (48/241) olarak görülmüştür. Neonatal ishali buzağılarda % 15,7 (17/108), 1-3 aylık ishali buzağılarda % 23,1 (30/130), 4-6 aylık ishali buzağılarda % 33,3 (1/3) oranlarında *Cryptosporidium* ookisti tespit edilmiştir. Sağlıklı buzağılarda *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı ise % 19,8 (38/192) olarak belirlenmiştir. Bu oran sağlıklı neonatal buzağılarda % 17,8 (8/45), 1-3 aylık sağlıklı buzağılarda % 21,5 (26/121), sağlıklı 4-6 aylık buzağılarda % 15,4 (4/26) olarak saptanmıştır.

Ookist atılım yoğunluğu ishali buzağılarda % 8,7’sinde (21/241) +, % 3,7’sinde (9/241) ++, % 7,5’de (18/241) ise +++ olarak değerlendirilmiştir. Normal dışkı olan sağlıklı buzağılarda ise % 9,4’ü (18/192) +, % 3,1’i (6/192) ++, % 7,3’ü (14/192) +++ olarak belirlenmiştir. Ookist atılım yoğunluğu ineklerin % 10,6’sında (39/369) +, % 5,4’ünde (20/369) ++, % 2,2’sinde (8/369) +++ olarak bulunmuştur. Ookist atılımının ishali hayvanlarda yüksek, ineklerde ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmada çalışılan 62 çiftlik/ahır hayvan sayısına (sürü büyüklüğüne) göre üç gruba ayrılmıştır. Bunlardan hayvan sayısının 1-15 olduğu işletmelerde *Cryptosporidium* ookit dağılımının % 33,3 olduğu halde, hayvan sayısının 30'un üzerinde olduğu işletmelerde ise bu oranın % 66,7 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu işletmelerde buzağı sayısı arttıkça *Cryptosporidium* türlerinin yaygınlığında arttığı görülmüştür. Buzağı sayısının 10'dan fazla olduğu çiftliklerde *Cryptosporidium* türlerinin yaygınlığı % 44,4 olarak bulunmuştur.

Dışkıda *Cryptosporidium* etkenlerinin teşhisinde son yıllarda moleküler tanı metotları ve serolojik tanıda cryptosporidiosis teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hamnes ve ark. 2006, Jex ve ark. 2008, Lefay ve ark. 2000, Sungur ve ark. 2008). Moleküler teşhis metodlarından olan nested PCR'in rutin muayene yöntemlerinden olan Carbol fuksine göre daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Sungur ve ark. 2008). Son yıllarda *Cryptosporidium* etkenlerini tür düzeyinde ve hatta o türün subtiplerini belirlemek için moleküler tekniklerden PCR yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu teknikle dışkıdan *Cryptosporidium* ookitleri elde edilmekte yani izolat hazırlanmakta ve DNA ekstraksiyonu yapılarak total (genomik) DNA elde edilmektedir. Daha sonra ise SSU rRNA gen amplifikasyonu yapılarak *Cryptosporidium* pozitif PCR ürünleri elde edilmektedir. Yani o dışkı örneğinde *Cryptosporidium* olup olmadığı belirlenmektedir. Pozitif PCR ürünleri ise *SspI*, *VspI* ve *MboII* restriksiyon enzimleri kullanılarak elektroforeze tabi tutulup, RFLP bant modelleri dikkate alınarak *Cryptosporidium* tür teşhisleri yapılmaktadır. Ayrıca sekans analizi yapılarak teşhis doğrulanmaktadır. *Cryptosporidium parvum* örneklerinde ise GP60 gen analizi yapıp, sekans analiz sonucu subtipler belirlenmektedir (Altschul ve ark. 1990, Jex ve ark. 2008, Trotz-Williams ve ark. 2005, Xiao ve Ryan 2008). Bu moleküler karakterizasyon işlemleri sonucu hangi subtip veya subgenotiplerin bulunduğu belirlenmektedir. Bu araştırma ile de Türkiye'de ilk defa *Cryptosporidium* cinsi protozoonun subtiplerinin ortaya konulması hedeflenmiştir. Yapılan proje ve çalışmayla Kars yöresindeki sığırlarda, buzağı ve ineklerde, ishalleri olan ve olmayan sağlıklı buzağılarda *Cryptosporidium* türleri ve subtipleri saptanmıştır.

Türkiye’de sahip olduğu hayvan popülasyonu ile bölge ve ülkeye önemli düzeyde katkı sağlayan Kars ilinde sığıır yetiştiriciliği hayvancılık içerisinde ilk sırada gelmektedir. Mayıs-Ekim döneminde mera, Kasım-Nisan süresince kapalı yetiştirme biçiminde sığıır yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bölgede doğumlar Ocak ayı ile başlamakta Şubat ve Mart aylarında yoğunlaşmaktadır. Bahar ayları genç sığıırların ve buzağıların sayıca yaygın olduğu peryottur. Ancak son yıllarda buzağı doğumlarının yılın her dönemine yayılmaya çalışıldığı da görülmektedir. İşte buzağı sayısının fazla olduğu bahar mevsiminde buzağı ishallerine en yaygın olarak rastlanmaktadır. Sıklıkla görülen bu diyare olgularında bazı yıllarda *Cryptosporidium* türlerinin etiyojide önemli rol oynadığı kaydedilmiştir. Bazı yıllarda ishalleri buzağılar da % 30’lar düzeyinde görüldüğü ve hatta % 40’lara çıktığı bildirilmiştir. Klinikal cryptosporidiosis olgularında dikkati çeker boyutta olduğu bildirilmiştir (Arslan ve ark. 2001, Arslan 2005). Ancak son yıllarda hastalığın oldukça azaldığı da dikkati çekmektedir. *Cryptosporidium* izolatu elde etmek amacıyla yapılan saha çalışmalarında 2011 yılında buzağılarda bu protozoonun % 5’ler düzeyine kadar düştüğü görülmüştür. Özellikle neonatal buzağılarda önemli olduğu bildirilen (Çitil ve ark. 2004) *Cryptosporidium* enfeksiyonlarına yöredeki kuzular da da rastlanmaktadır (Sarı ve ark. 2009). Kars’ta yapılan bu araştırmalarda hayvanlarda *Cryptosporidium* varlığı belirlenmiş ve epidemiyolojik bazı veriler tartışılmıştır. Ayrıca ishalleri buzağılarda *C. parvum* tipII saptanmıştır (Tanrıverdi ve ark. 2003, Tanrıverdi ve ark. 2006). Yapılan bu çalışma ile bölgede ishalleri ve sağlıklı buzağılarda ve ergin sığıırlarda (ineklerde) tür düzeyinde *Cryptosporidium* patojenleri belirlenmiş ve *C. parvum*’un subtipleri ortaya konulmuştur.

Türkiye’de hayvanlarda *Cryptosporidium* türlerinin varlığı ilk olarak 1984’te buzağılarda bildirilmiştir (Burgu 1984). Daha sonraki yıllarda ise buzağılarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları üzerinde; Elazığ (Özer ve ark. 1990), Aydın (Özlem ve ark. 1997), Ankara (Irmak ve Şahal 1993, Şahal ve ark. 2005). Sivas (Değerli ve ark. 2005, Mamak ve ark. 2000), Erzurum (Sarı ve ark. 2008), Van (Gül ve ark. 2008) ve Konya’da (Sevinç ve ark. 2003, Sevinç ve ark. 2005) araştırmalar yapılmış ve *Cryptosporidium* görülme sıklığı ve prevalansları ile ilgili veriler bildirilmiştir. Bugüne kadar hayvanlarda *Cryptosporidium* türlerinin moleküler prevalansı ve

karakterizasyonu ile ilgili Nevşehir ve Aydın illerindeki ishallerde buzağılarda araştırmalar (Aysul ve ark. 2009, Şimşek ve ark. 2011) yapılmıştır. Aydın yöresindeki ishallerde buzağılarda PCR-RFLP sonucu *C. parvum* türü teşhis edilmiş olup, bu türün yaygınlığı % 24,2 oranında belirlenmiş ve sekans analizi ile de *C. parvum* türü doğrulanmıştır. Şimşek ve ark. (2011), Real Time PCR ile buzağılarda *C. parvum* yaygınlığını % 15,3 (23/150) olarak bulmuşlardır. Ayrıca *C. ryanae* (2/150), *C. bovis* (1/150) türleri de saptanmıştır. Kars yöresindeki ishallerde buzağılarda PCR-RFLP ile yapılan bu çalışmada *C. parvum* görülme sıklığı % 22,2 (8/36) olarak saptanmıştır. Bu oran diğer çalışmalarla (Aysul ve ark. 2009) bezerlik göstermektedir. Ayrıca Kars yöresindeki diyareli buzağılarda en yaygın türün *C. parvum* olduğu belirlenmiş olup, *C. bovis* ve *C. ryanae* türleri de tespit edilmiştir.

Sığırlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının hem veterinerlik ve hem de beşeri hekimlik yönünden önemli olması nedeniyle dünya da sığır cryptosporidiosisi üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır. Sığırlardan da yaş grubu olarak buzağılarda çalışmaların daha sıklıkla yapıldığı görülmektedir (Santin ve Trout 2008). Tüm dünya ülkelerinde özellikle gelişmiş ülkelerde bu araştırmalar daha ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Avrupa kıtasında İsveç (Silverlas ve ark. 2009), Almanya (Broglia ve ark. 2008), Fransa (Lefay ve ark. 2000), Norveç (Hamnes ve ark. 2006), Çek Cumhuriyeti (Kvac ve ark. 2006), İngiltere (Brook ve ark. 2008) ve Kuzey İrlanda (Thompson ve ark. 2007)'da sığırlarda *Cryptosporidium* etkenlerinin görüldüğü ve buzağılarda bu protozoonun daha yaygın olduğu kaydedilmiştir. *Cryptosporidium* prevalansı, ABD'nde süt kesim öncesi (<2 aylık) buzağılarda % 41'lere kadar çıkmakta (Santin ve ark., 2004), 3–12 aylıklarda % 18,5 ve 12–24 aylık sığırlarda % 2.2 oranında görülmektedir (Santin ve ark. 2008). Kanada'da buzağılarda *Cryptosporidium* prevalansının genel ortalama yaygınlığın % 30'lar düzeyinde olduğu, sürü prevalansının ise % 80 oranlarında saptandığı belirtilmiştir (Coklin ve ark. 2007, Coklin ve ark. 2009, Trotz-Williams ve ark. 2008). Cryptosporidiosisin Arjantin (Del Coco ve ark. 2008) ve Hindistan'da (Paul ve ark. 2008, Singh ve ark. 2006) buzağı ishallerinde önemli bir yere sahip olduğu, Zambia (Geurden ve ark. 2006) ve İran'da (Keshavarz ve ark. 2009) sütçü işletmelerdeki buzağılarda daha yaygın görüldüğü bildirilmiştir. Kars yöresindeki işletmelerde

genel olarak sütçü işletme tarzındadır. Bu işletmelerde buzağular da yaygın olmak üzere tüm yaş grubu sığırlarda *Cryptosporidium* etkenleri saptanmıştır.

Sığırlarda bildirilen *Cryptosporidium* türleri *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* ve *C. ryanae*'dir. Bu türlerden *C. parvum* konak spektrumu en geniş olan tür olup, genellikle 2–3 aylık öncesi buzağularda daha yaygındır. *Cryptosporidium bovis*, *C. andersoni* ve *C. ryanae* türleri ise üç aylıktan büyük ya da süttten kesim sonrası yaşlardaki sığırlarda sıklıkla görülen türlerdir (Fayer 2008, Feng ve ark. 2007, Kvac ve ark. 2006, O'handley ve Olson 2006). Daha önceden *Cryptosporidium* geyik genotipi olduğu bildirilen (Fayer ve ark. 2007) türü *C. ryanae* olarak tanımlanmıştır (Fayer, 2010). Bu türe buzağularda ve yaşlı sığırlarda rastanmıştır (Santin ve ark. 2004). Bu çalışmada dünyada sığırlarda bildirilen türlerden *C. parvum*, *C. bovis* ve *C. ryanae* Kars yöresindeki sığırlarda tespit edilmiştir. Her yaş grubundaki sığırdaki yani buzağı ve ineklerde her üç türde bulunmuştur. Buzağularda *C. parvum* daha yaygın görüldüğü halde, *C. ryanae* türü yaşlılarda daha yüksek oranda saptanmıştır. Sağlıklı ve ishelli buzağularda her üç türde tespit edilmiştir. Klinik olarak normal dışkı olan sağlıklı buzağularda ve ineklerde *C. parvum* türü ilk olarak bu çalışma ile bildirilmiştir. Ayrıca bu hayvanlarda *C. bovis* ve *C. ryanae* türleri bildirimini de ilk kayıtlardır. Sığırlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları etiolojisinde bildirilen *C. andersoni* türü ise Kars'taki sığırlarda saptanmamıştır.

Dünyanın değişik ülkelerinde yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* türleri tespit edilmiştir. Almanya'da neonatal buzağularda *C. parvum* (Broglia ve ark. 2008), İngiltere'de ise sığırlarda *C. parvum* olmak üzere *C. bovis* ve *Cryptosporidium* geyik genotipi bulunmuştur (Brook ve ark. 2008; 2009). Kuzey İrlanda'da neonatal cryptosporidiosisde *C. parvum*'un en yaygın tür olduğu (Thompson ve ark. 2007) ayrıca *C. bovis*, *C. andersoni* ve *Cryptosporidium* geyik genotipi (Santin ve ark. 2004, Fayer ve ark. 2006) bildirilmiştir. Kanada'da buzağularda *C. parvum* ve *C. bovis* (Coklin ve ark. 2007, Coklin ve ark. 2009, Trotz-Williams ve ark. 2008), Hindistan'da da ishelli buzağularda *C. parvum* türünün görüldüğü kaydedilmiştir (Paul ve ark. 2008, Singh ve ark. 2006). Zambia'da *C. parvum* ve *C. bovis* türleri saptanmış ve bir buzağıda *C. suis* bildirilmiştir (Geurden ve ark. 2006). İran'da

buzağılarda *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* (Keshavarz ve ark. 2009) türleri tanımlanmıştır. Kars yöresindeki sığırlardan elde edilen *Cryptosporidium* izolatlarından PCR-RFLP ile yapılan analiz ve konfirmasyon için yapılan sekans analizleri neticesinde *Cryptosporidium* türleri tanımlanmıştır. Kars yöresindeki sığırlarda *C. andersoni* hariç diğer üç tür saptanmıştır. Modifiye asit fast boyama ile pozitif olarak değerlendirilen 129 dışkı örneğinden 80'inde (% 62,0) *Cryptosporidium*'türleri yönünden pozitif olan PCR ürünü elde edilmiştir. Bu PCR ürünlerinden yapılan Nested PCR ve RFLP sonucu sığırlarda *C. parvum* % 16,3 (13/80), *C. bovis* % 45,0 (36/80) ve *C. ryanae* % 38,8 (31/80) oranlarında bulunmuştur. Kars yöresindeki sığırlarda *C. bovis* en yaygın olarak görülen tür olmuştur.

Sığırlarda *Cryptosporidium* türlerinin moleküler karakterizasyonu için dışkı örneği toplanan 20 odak/yerleşim yerinin 9'unda *C. parvum* saptanmıştır. *Cryptosporidium* türlerinin yaş gruplarına göre dağılımı; Buzağılarda *C. parvum* % 20,0 (10/50), *C. bovis* % 46,0 (23/50), *C. ryanae* % 34,0 (17/50), ergin sığırlarda ise *C. parvum* % 10,0 (3/30), *C. bovis* % 43,3 (13/30), *C. ryanae* % 46,7 (14/30) oranlarında olmuştur. İshalli buzağılarda % 22,2 (8/36)'ler düzeyinde *C. parvum* bulunması buzağı ishalleri ve zoonotik açıdan dikkate alınması gereken bulgular olmuştur. *Cryptosporidium parvum* saptanan 13 sığırın 10'u (% 76,9) buzağı, 3'ü (% 23,1) ise ergin sığırdır. Ayrıca *C. parvum* saptanan buzağıkların büyük çoğunluğunun (% 80,0; 8/10) ise ishalleri olduğu görülmüştür. Yine *C. parvum* saptanan hayvanlarda ookist atılımının daha yoğun olduğu belirlenmiştir.

Dışkıda ookist yoğunluğu durumunu mAF boyama ile hazırlanan preparatlardaki ookistler sayılarak yapılmıştır (Burgu 1984 Castro-Hermida ve ark. 2002, Çitil ve ark. 2004, Sarı ve ark. 2009). *Cryptosporidium parvum* saptanan örneklerin 6'sında (6/13) +++, 4'ünde (4/13) ++ ve 3'ünde ise (3/13) + düzeyinde ookist yoğunluğu puanlanmıştır. Bu çalışma da bir yaş üzerindeki sığırlarda *Cryptosporidium* etkenleri diğer araştırmalara göre daha yüksek bulunmuştur. Bunda etkili olabilecek en önemli faktörün bu çalışmada dışkı örneği alınan ergin sığırların genellikle inek olmalarıdır. Ayrıca materyal toplama zamanında ineklerin çoğunlukla

periparturient dönemde olmaları da etkili olabilecek faktörler olarak değerlendirilebilir. Bu konuda yeni araştırmaların yapılmasına ihtiyaç olduğuda unutulmamalıdır.

Medikal ve veterinerlik yönünden *Cryptosporidium* türleri içerisinde *C. hominis* ve *C. parvum* en önemli türlerdir. Çünkü her iki tür insanlarda bulunur ve cryptosporidiosis'e neden olur. Bunlardan *C. parvum* ise insan cryptosporidiosisinde etiyolojik olarak önemli bir ajandır. Ayrıca *C. parvum* buzağular başta olmak üzere sığırlarda yaygın enteropatojen türdür. Hem insan ve hemde hayvanlarda görülen *C. parvum*'un Ila, Ilb, Ilc, Ild, Ile, Ilf, Ilg, Ilh, Ili, Ilk ve Ill olmak üzere 11 suptip familyası bulunmaktadır (Xiao 2010). Bunlardan Ila, Ilb ve Ild zoonotiktir ve en yaygın olanıda *C. parvum* Ila subtipi ya da subtip familyasıdır. Dünyada en yaygın olarak görülen zoonotik subtipler (subgenotipler) ise IlaA15G2R1 ve IlaA18G3R1'dir (Nichols 2008, Santin ve Trout 2008, Xiao ve Ryan 2008). Hem sığırlarda ve hem de HIV pozitif insanlarda *C. parvum* IlaA15G2R1 subtipinin daha yaygın görülmesi halk sağlığı yönünden önemlidir (Alves ve ark. 2006). Bu noktadan hareketle tüm dünyada özellikle gelişmiş ülkelerde *Cryptosporidium parvum* türünün subtiplerinin/subgenotiplerinin belirlenmesine yönelik çok sayıda araştırma yapılmaktadır.

Almanya'da *C. parvum* Ila ile IlaA15G2R1 subtipi yaygın (% 81,1) olarak bulunmuştur (Broglia ve ark. 2008). İngiltere'de sığırlara Ila subtip familyası ve bu familyaya bağlı altı farklı subtip tespit edilmiştir. En yaygın subtipin ise IlaA15G2R1'in olduğu bildirilmiştir (Brook ve ark. 2008, 2009). Kuzey İrlanda'da *C. parvum*'un 16 adet subtipi saptanmış en yaygın görülenlerin ise IlaA18G3R1 ve IlaA15G2R1 subtipleri olduğu kaydedilmiştir (Thompson ve ark. 2007). Macaristan'da süt kesim öncesi yaşlardaki buzağularda *C. parvum* Ila ve *C. parvum* Ild subtip familyaları saptanmış olup, IlaA16G1R1 subtipi yaygın (% 71,4) bulunmuştur (Plutzer ve Karanis 2007). Hollanda'da sığırlarda *C. parvum* IlaA15G2R1 subtipi (Wielinga ve ark. (2008), Portekiz'de sığırlardan insanlara bulaşan *C. parvum* Ila ve Ild subtip familyaları tespit edilmiştir (Alves ve ark. 2006). Amerika Birleşik Devletleri'nde buzağularda zoonotik olan Ila subtip familyası ile

buna bağı altı subtip tespit edilmiş ve yaygın olan subtipin ise IIAA15G2R1 olduğu bildirilmiştir (Santin ve ark. 2008, Xiao ve ark. 2007). İnan'da buzağılarda *C. parvum*'un IIAA15G2R1, IIAA16G3R1 ve IIDAA15G1 subtipleri belirlenmiş olup, en yaygın subtipin IIAA15G2R1 (22/25) olduğu kaydedilmiştir (Nazemalhosseini-Mojarad ve ark. 2011). Kars yöresindeki sığırlarda PCR-RFLP ile teşhisi yapılan 13 adet *C. parvum* türünün yapılan sekans analizi sonucu IIA ve IID subtip familyaları saptanmıştır. Buzağıların tümünde IIA, ineklerde ise IIA ve IID subtip familyası tespit edilmiştir. Bu subtip familyalara bağı olarak ise IIAA15G2R1, IIAA16G3R1 ve IIDAA15G1 subtipleri bulunmuştur. Dünya'nın birçok ülkesinde sığırlarda yaygın olarak bildirilen *C. parvum* IIAA15G2R1 subtipi Türkiye'nin Kars yöresindeki sığırlarda da en yaygın olarak bulunmuştur. Buzağılarda IIAA15G2R1, IIAA16G3R1 subtipleri saptanmış, ineklerde ise IIAA15G2R1, IIAA16G3R1 ve IIDAA15G1 subtipleri belirlenmiştir. *Cryptosporidium parvum* saptanan 10 buzağının 8'inde IIAA15G2R1 subtipi tespit edilmiştir.

Bu çalışma ile Kars yöresindeki sığırlarda zoonotik olan subtip familyaları ile subtipler belirlenmiştir. Türkiye'de ilk olarak bu araştırma ile *C. parvum* türünün subtipleri ortaya konulmuştur. Örnek sayısının artırılması ile yeni subtiplerin bulunabileceği açıktır. Kars yöresindeki daha önce yapılan araştırmalarda (Tanrıverdi ve ark. 2003, Tanrıverdi ve ark. 2006) buzağılarda sadece *C. parvum* tip II bildirilmiştir. Bu çalışma da da buzağılarda ve daha ergin sığırlarda *C. parvum* II saptanmıştır. Bu çalışma ile ishalleri buzağılarda da *C. parvum* IIAA15G2R1 subtipinin sorumlu etiyolojik ajan olduğu saptanmıştır. Özellikle ishalleri buzağuların dışkıları ile daha fazla okist çıkarmalarından dolayı, insanlara bulaşımında ve buzağı ishallerinde en önemli subtip olacağı düşünülmelidir.

Sonuç olarak Kars yöresindeki sığırlarda *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı ve moleküler karakterizasyonu adlı bu çalışma ile;

- Kars yöresinde modifiye asit fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* türlerinin yerleşim yerlerinde (odaklarda) görülme oranı % 53,3 (16/30) olarak bulunmuş,

- *Cryptosporidium* türlerinin çiftlik dağılımı % 41,9 (26/62) olarak saptanmış,
- Sığırlarda *Cryptosporidium* türlerinin genel dağılımı % 19,1 (166/870) oranında bulunmuş,
- *Cryptosporidium* ookistlerinin buzağı altlık örneklerindeki görülme oranı % 38,3 (23/60) olarak belirlenmiş,
- *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı buzağılarda % 19,9 (86/433) ve altı aylıktan büyük hayvanlarda % 18,3 (80/437) düzeyinde tespit edilmiş,
- *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı; neonatal buzağılarda % 16,3 (25/153), 1-3 aylık buzağılarda % 22,3 (56/251), 4-6 aylık buzağılarda % 17,2 (5/29), 7-24 aylıklarda % 19,1 (13/68) ve ineklerde % 18,2 (67/369) oranlarında belirlenmiş,
- İshalli buzağılarda *Cryptosporidium* ookistlerinin dağılımı % 19,9 (48/241) bulunmuş,
- Çiftlik veya ahırdaki hayvan sayısı arttıkça *Cryptosporidium* görülme oranında yükseldiği görülmüş,
- Kars ve çevresindeki sığırlarda cryptosporidiosis etiyojisinde rol alan *Cryptosporidium* türlerinin *C. parvum*, *C. bovis* ve *C. ryanae* olduğu belirlenmiş,
- Buzağı ve ergin sığırlarda bu üç *Cryptosporidium* türü bulunmuş,
- Buzağılarda *C. bovis* % 46,0, *C. ryanae* % 34,0, *C. parvum* % 20,0 oranlarında tespit edilmiş ve *C. bovis* en yaygın tür olarak kaydedilmiş, ergin sığırlarda ise *C. ryanae* % 46,7, *C. bovis* % 43,0 ve *C. parvum* % 10,0 oranlarında saptanmış ve *C. ryanae* en yüksek düzeyde belirlenmiş,
- İshalli buzağılarda *C. bovis* % 41,7, *C. ryanae* % 31,1, *C. parvum* % 22,2; sağlıklı buzağılarda ise *C. bovis* % 57,1, *C. ryanae* % 28,6 ve *C. parvum* % 14,3 olarak belirlenmiş,
- *Cryptosporidium parvum*'un iki subtip familyası (IIa ve IId) ve bu familyalara bağlı üç subtip (IIaA15G2R1, IIaA16G3R1 ve IIdA15G1) tanımlanmış,
- Kars yöresindeki sığırlarda *C. parvum*'un IIa subtip familyası ile IIaA15G2R1 subtipinin yaygın olarak bulunduğu gözlenmiş,

- *Cryptosporidium parvum* saptanan buzağuların çoğusunun ishalleri olduğu, bu hayvanlarda *C. parvum* IIA subtip familyası ve IIAA15G2R1 subtipi/subgenotipi daha yaygın olarak görülmüş,
- *Cryptosporidium parvum*'un zoonotik olan ve dünyada da sıklıkla görülen tip ve subtipinin bölgede daha yaygın olduğu belirlenmiştir.

Kars yöresindeki sığırlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları üzerine yapılan bu moleküler etiyojik araştırma sonuçlarına göre yapılan,

Öneriler şunlardır:

- Kars yöresindeki sığır işletmelerinde klinik olarak ortaya çıkan buzağı ishallerinde *Cryptosporidium* enfeksiyonları göz önünde bulundurulmalı,
- Buzağularda *C. parvum* enfeksiyonlarına karşı, çiftlik ve ahırlarda koruyucu tedbirler alınmalıdır. Bu amaçla meme civarı temizliği, buzağuların annelerinden ayrı farklı bir ahırda yer alması, buzağuların farklı yaş gruplarına göre (ilk bir haftalık buzağı, 2–4 haftalık buzağı, 1–3 aylık buzağı, 4–6 aylık buzağı) ayrı ayrı bölmelerde bulundurulması, buzağı altlıklarının düz ve temizlenebilir hale getirilmesi için uygulamalar yapılmalı,
- Kars yöresindeki çiftlik ve köylerde bulunan ishalleri buzağular başta olmak üzere tüm yaş grubu sığırlarda cryptosporidiosis moleküler epidemiyolojisi ile ilgili araştırmalara devam edilmeli,
- Klinik cryptosporidiosis olgularının takibi yapılarak daha fazla sayıda *C. parvum* izolatu elde edilmeli ve bunların subtipleri belirlenmeli,
- Klinikal *Cryptosporidium* enfeksiyonu olgularına bağlı buzağı ölümlerini en aza indirebilmek için buzağular ishal görülmeye başladığı zaman vakit kaybetmeden tedaviye başlanmalı,
- Klinik cryptosporidiosis olgularında; halofuginone lactate, lasalocid-Na, β -cyclodextrin, α -cyclodextrin, decoquinate, paromomycin, sinefungin, nitazoxanide, latrazuril ve atovaquone gibi anticryptosporidial ilaçlar ile buzağular tedavi edilmeli,

- Cryptosporidiosis'e bağlı verim kayıplarını ve buzağılarda ölüm olaylarını asgariye indirmek ve ülke ekonomisine katkı sağlamak için bölgede ve Türkiye genelinde veteriner hekim ve yetiştirici eğitim programları yapılmalı,
- Kars çevresinde *Cryptosporidium* saptanan odaklardaki yaşayan insanlar başta olmak üzere çocuklar, yaşlılar, uzun süre hastanede yatanlar, immun sistemi yetersiz ya da baskılanmış olanlar gibi tüm risk gruplarında *Cryptosporidium* enfeksiyonları durum tespiti yapılmalı,
- Kars ilinde *Cryptosporidium* pozitif tespit edilen yerleşim yerlerindeki içme sularında *Cryptosporidium* türleri üzerine çalışmalara başlanmalı,
- *Cryptosporidium* salgınlarında büyük risk oluşturan özellikle içme suları başta olmak üzere köy ve şehir şebeke sularında, halkın içme suyu olarak kullandığı mera ve arazilerdeki kaynak sularında, ahırlardaki hayvan içme sularında, bireysel tüketilen kuyu sularında *Cryptosporidium* durumu hakkında araştırmalar yapılmalı,
- Türkiye genelinde belirlenecek *Cryptosporidium* riskli bölgelerde; “*Cryptosporidium* su arıtma” ya da “*Cryptosporidium* filtrasyon cihazları” geliştirilip, evlerde kullanıma sunulmalı,
- Türkiye’de “Crypto- Güvenli Su” bilinç ve sloganı oluşturulmalı,
- Filtrasyon işlemine tabi tutulmamış ya da herhangi bir temizleme (su arıtma, dezenfeksiyon işlemleri gibi) yönteminden geçirilmemiş suları kullanan insanların ve bu tip sular ile kuyu suları-göl-gölet-suları gibi içen hayvanların *Cryptosporidium* enfeksiyonları yönünden büyük risk altında olduğu unutulmamalıdır.

ÖZET

Kars Yöresinde Sığırlarda *Cryptosporidium* Türlerinin Dağılımı ve Moleküler Karakterizasyonu

Bu çalışma, Kars yöresinde sağlıklı ve ishalleri sığırlarda bulunan *Cryptosporidium* türleri ve bunların dağılımını belirlemek ve elde edilen *C. parvum* türünün subtiplerini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

Çalışma 2010 yılı Şubat-Haziran ayları arasında 30 köyden seçilen 62 çiftlikte yürütülmüştür. Sağlıklı ve ishalleri sığırların rektumlarından toplam 870 dışkı, buzağuların buldukları yerlerden de buzağı altlık örnekleri alınmıştır. Örnekler önce modifiye Asit Fast (MAF) boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* yönünden incelenmiş, pozitif olanlar doymuş NaCl yöntemi ile zenginleştirilerek DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere saklanmıştır. DNA ekstraksiyonu ticari kitlerle (Qiagen Stool Mini Kit) yapılmıştır. *Cryptosporidium* türlerini ortaya koymak amacıyla bu soyun 18S rRNA gen bölgesini hedef alan nested PCR yapılmıştır. Farklı türlerin ortaya konması için PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. *Cryptosporidium parvum* alt türlerini ortaya koymak için ise GP60 gen bölgesi çoğaltılıp elde edilen ürünler saflaştırılarak sekans analizi yapılmıştır.

Modifiye asit fast boyama yöntemi ile 870 dışkı örneğinin 166'sında *Cryptosporidium* oocistleri görülmüştür. Oocistlere 60 buzağı altlık örneğinin 23'ünde rastlanmıştır. *Cryptosporidium* türlerinin yerleşim yerlerinde görülme oranı % 53,3 (16/30), bu yerleşim yerlerindeki çiftlik dağılımı % 41,9 (26/62) olarak bulunmuştur. *Cryptosporidium* türlerinin dağılımı; neonatal buzağularda % 16,3 (25/153), 1-3 aylık buzağularda % 22,3 (56/251), 4-6 aylık buzağularda % 17,2 (5/29), 7-24 aylıklarda % 19,1 (13/68) ve ineklerde % 18,2 (67/369) oranlarında belirlenmiştir. Modifiye asit fast boyama ile *Cryptosporidium* pozitif sayılan 129 dışkı örneğinin 80'inde (% 62,0) *Cryptosporidium* pozitif PCR ürünü belirlenmiştir. Kars yöresindeki sığırlarda *C. parvum* (% 16,2; 13/80), *C. bovis* (% 45,0; 36/80) ve *C. ryanae* (% 38,8; 31/80) türleri saptanmıştır. Buzağularda *C. parvum* % 20,0, *C.*

bovis % 46,0, *C. ryanae* % 34,0, ergin sığırlarda ise *C. parvum* % 10,0, *C. bovis* % 43,3, *C. ryanae* % 46,7 oranlarında bulunmuştur. İshalli buzağılarda *C. parvum* daha yaygın (% 61,5; 8/13) görülmüştür. *Cryptosporidium parvum*'un IIa (12/13) ve IId (1/13) subtipleri ve bunların IIaA15G2R1 (10/13), IIaA16G3R1 (2/13) ve IIdA15G1 (1/13) subtipleri/subgenotipleri tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; Kars yöresindeki sığırlarda *Cryptosporidium* dağılımının yüksek olduğu, zoonotik olan *C. parvum* IIa subtip familyası ve IIaA15G2R1 subtipinin yaygın olduğu saptanmıştır. Bu sonuç zoonotik *Cryptosporidium* potansiyeli nedeniyle bölgedeki buzağıkların insanlar için önemli risk olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, Sığır, Buzağı, Moleküler Karakterizasyon, 18S rRNA, GP60, Subtip, Kars

SUMMARY

Distribution and Molecular Characterisation of *Cryptosporidium* Species in Cattle in Kars Region of Turkey

This study was carried out to obtain the distribution and species composition of *Cryptosporidium* spp in cattle in Kars region of Turkey and further demonstrate the subtypes of *C. parvum*.

The study was carried out between February-June 2010 in 62 farms selected from 30 localities. Fecal samples were taken from rectum of the animals and base of calf housing. Samples were examined by mAF and positive ones were subjected to NaCl flotation and further processed for DNA extraction. Nested PCR was utilized to amplify a region of *Cryptosporidium* 18S rRNA. Positive samples were processed by RFLP to discriminate the species. DNA of *C. parvum* positive samples was later subjected to PCR aiming to amplify GP60 gene. PCR products were sequenced in order to discriminate *C. parvum* subtypes.

Cryptosporidium oocysts were observed in 166 out of 870 fecal samples by mAF. Oocysts were found in 23/60 fecal samples obtained from calf housings. The distribution was 16/30 and 26/62 at locality and farm level respectively. Oocysts were observed in 25/153, 56/251, 5/29, 13/68 and 67/369 neonatal, 1-3, 4-6, 7-24 months old calves and cattle respectively. Positive amplification products were obtained from 80 out of 129 mAF positive samples subjected to nested PCR. Three species were observed; *C. parvum* 13/80, *C. bovis* 36/80 and *C. ryanae* 31/80. In calf species was as 20.0% *C. parvum*, 46.0% *C. bovis* and 34.0% *C. ryanae*, while in old cattle it was as 10.0% *C. parvum*, 43.3% *C. bovis* and 46.7% *C. ryanae*. *Cryptosporidium parvum* was higher (8/13) in diarrhoeic calves. Sequencing revealed 12/13 IIa (10 IIaA15G2R1, 2 IIaA16G3R1) and 1/13 IId (IIdA15G1) subtype/subgenotypes of *C. parvum*.

According to the,

The result of this study should that the distribution of *Cryptosporidium* species is high in Kars region. The high prevalence of zoonotic IIaA15G2R1 subtype/subgenotypes of *C. parvum* may possess threat to human health as well.

Keywords: *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, Cattle, Calves, Molecular characterization, 18S rRNA, GP60, Subtype, Kars, Turkey

KAYNAKLAR

- Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, Deng M, Liu C, Widmer G, Tzipori S, Buck GA, Xu P, Bankier AT, Dear PH, Konfortov BA, Spriggs HF, Iyer L, Anantharaman V, Aravind L, Kapur V: Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*, 304: 441-5, 2004.
- Anon: Kars Meteoroloji Bölge Müdürlüğü. Kişisel görüşme ve resmi yazışma sonuçları, 2011.
- Altschuls F, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215: 403-410, 1990.
- Ak M: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). İçinde: Özcel MA, Altıntaş N (Eds): Parazit Hastalıklarında Tanı. s. 241–259, Türkiye Parazitolojisi Derneği Yayınları, No: 15, İzmir. 1997.
- Alves M, Xiao L, Antunes F, Matos O: Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitol Res*, 99(3): 287-292, 2006.
- Arslan MÖ: Kars yöresindeki buzağılarda cryptosporidiosis sorunu. VI. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi, s. 16, 4–7 Temmuz 2005, Kars.
- Arslan MÖ, Gıcık Y, Erdoğan HM, Sarı B: Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocyst in diarrhoeic calves in Kars province, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 25: 161-164, 2001.
- Arslan MÖ, Sarı B, Kara M, Taşçı GT, İtik Ekinci A, Gündüz N: Kars Yöresinde periparturient dönemdeki ineklerde *Eimeria* ve *Cryptosporidium* türlerinin yaygınlığı üzerine araştırmalar. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18(Suppl-A): A65-A70, 2012.
- Arslan MÖ, Çitil M, Erdoğan HM: Buzağılarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Program ve Özet Kitabı, PB048, s. 227, 5–10 Eylül 2011, Kars.
- Ayinmode AB, Fagbemi BO: Prevalence of *Cryptosporidium* infection in cattle from South Western Nigeria. *Vet Arhiv*, 80(6): 723-731, 2010.
- Aysul N, Ulutaş B, Ünlü H, Hoşgör M, Atasoy A, Karagenç T: Aydın ilinde ishalleri

buzağılarda bulunan *Cryptosporidium* türlerinin moleküler karakterizasyonu.

16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Program ve Özet Kitabı, SB-15, s. 208, 1-7 Kasım 2009, Adana.

- Becher KA, Robertson ID, Fraser DM, Palmer DG, Thompson RCA: Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Vet Parasitol*, 123: 1-9, 2004.
- Broglia A, Reckinger S, Caccio SM, Nöckler K: Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Vet Parasitol*, 154 (1-2), 8-13, 2008.
- Brook EJ, Hart CA, French NP, Christley RM: Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Vet J*, 179(3): 378-382, 2009.
- Brook EJ, Hart CA, French NP, Christley RM: Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. *Vet Parasitol*, 152: 46–52, 2008.
- Borowski H, Clode PL, Thompson RC: Active invasion and/or encapsulation. A Reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. *Trend Parasitol*, 24(11): 507-16, 2008.
- Bowman DD: *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 9th ed. Saunders Elsevier, St Louis. 2009.
- Burgu A: Türkiye’de buzağılarda *Cryptosporidium*’ların bulunuşu ile ilgili ilk çalışmalar: Ankara Üniv Vet Fak Derg, 31(3): 573-585, 1984.
- Carey CM, Lee H, Trevors JT: Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res*, 38: 818-862, 2004.
- Castro-Hermida JA, Gonzalez-Losada YA, Ares-Mazas E: Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol*, 106: 1-10, 2002.
- Chalmer RM, Davies AP: Clinical cryptosporidiosis. *Exp Parasitol*, 124: 138-146, 2010.
- Clark DP: New insights into human cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev*, 12(4): 554-563, 1999.

- Coklin T, Farber J, Parrington L, Dixon B: Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol*, 150: 297-305, 2007.
- Coklin T, Uehlinger FD, Farber JM, Barkema HW, O'Handley R.M, Dixon B.R: Prevalence, molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canada. *Vet Parasitol*, 160:(3-4) 323-326, 2009.
- Çeber K, Aslan G, Otag F, Delialioğlu N, Öztürk C, Babür C, Emektaş G: Mersin ilinde içme suyu, kullanma suyu, atık su ve deniz sularında *Cryptosporidium* spp. oookistlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 29(4): 224-228, 2005.
- Çetinkaya F: *Cryptosporidium parvum*'un bulaşmasında su ve gıdaların rolü. *Uludağ Univ J Fac Vet Med*, 23(1-2-3): 103-109, 2004.
- Çitil M, Arslan MÖ, Güneş V, Erdoğan HM: Neonatal buzağı ishallerinde *Cryptosporidium* ve *Eimeria* enfeksiyonlarının rolü. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 10(1): 59-64, 2004.
- Değerli S, Çeliksöz A, Kalkan K, Özçelik S: Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves in Sivas. *Turk J Vet Anim Sci*, 29: 995-999, 2005.
- De Graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-More LM, Abbassi H, Peeders JE: A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol*, 29: 1269-1287, 1999.
- Del Coco VF, Cordoba MA, Basualdo JA: *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. *Vet Parasitol*, 31-35, 2008.
- Dirim D, Turgay N, Alkan MZ: Bir cryptosporidiosis olgusunun Kinyoun asit-fast boyası ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile takibi. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 27(4): 237-239, 2003.
- Dubey JP, Speer CA, Fayer R: *Cryptosporidiosis of man and animals*. CRC Press, Boca Raton. pp. 199, 1990.
- Emre Z, Alabay M, Düzgün A, Çerçi H: Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cattle faecal specimens. *Turk J Vet Animal Sci*, 21: 293-296, 1997.

- Emre Z, Fidancı H: Prevalence of mix infections of *Cryptosporidium* spp. *Escherichia coli* K 99 and Rotavirus in the faeces of diarrhoeic and healthy cattle in Ankara, Turkey and in vitro resistance of *Escherichia coli* K 99 to antimicrobial agents. *Turk J Vet Anim Sci*, 22: 175-178, 1998.
- Fahey TMD: Cryptosporidiosis. *Infectious Disease Update*, 10(2): 75-80, 2003.
- Fayer R: *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol*, 126: 37-56, 2004.
- Fayer R: General Biology. In: Fayer R, Xiao L(Eds.): *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. pp. 1–41. CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
- Fayer R: Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol*, 214(1): 90-97, 2010.
- Fayer R, Gasbarre L, Pasquali P, Canals A, Almeria S and Zarlenga D: *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic, clinical, parasitic and immunologic patterns. *Int J Parasitol*, 28: 49-56, 1998.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ: Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission detection and identification. *Int J Parasitol*, 30: 1305-1322, 2000.
- Fayer R, Santin M, Trout JM: Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Vet Parasitol*, 145: 260-266, 2007.
- Fayer R, Santin M, Trout JM: *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol*, 156: 191-198, 2008.
- Fayer R, Santin M, Trout JM, Greiner E: Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2- year- old dairy cattle in the eastern United States. *Vet Parasitol*, 135: 105-112, 2006.
- Fayer R, Santin M, Macarisin D: *Cryptosporidium ubiquitum* n.sp. in animals and humans. *Vet Parasitol*, 172: 23-32, 2010.
- Feng Y, Ortega Y, He G, Das P, Xu M, Zhang X, Fayer R, Gatei W, Cama V, Xiao L: Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet Parasitol*, 144: 1-9, 2007.
- Fındık D: *Cryptosporidium*. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 18(2): 107-112, 1994.

- Geurden T, Goma FY, Siwila J, Phiri IGK, Mwanza AM, Gabriel S, Claerebout E, Vercruysse J: Prevalance and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia. *Vet Parasitol*, 138: 217-222, 2006.
- Gül A, Çiçek M, Kılınç Ö: Prevalence of *Eimeria* spp. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in calves in the Van province. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 32 (3): 202-204, 2008.
- Gül Y, Özdemir H: Kliniklerimizde ilk cryptosporidiosis olgusu. *Fırat Üniv Derg*, 4(1): 61-67, 1990.
- Gün H, Tanyüksel M, Haznedaroğlu T: Kanserli hastalarda *Cryptosporidium* araştırılması. *Türk Microbiol Cem Derg*, 24: 116-119, 1997.
- Hamnes IS, Gjerde B, Robertson L: Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Vet Parasitol*, 140: 204-216, 2006.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'3 exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 7276-80, 1991.
- Huang DB, Chappell C, Okhuysen PC: Cryptosporidiosis in children. *Semin Pediatr Infect Dis*, 15: 253-259, 2004.
- Irmak K: Yeni doğan buzağılarda deneysel cryptosporidiosis'de klinik, hematolojik değişiklikler ve sağaltım. Ankara Üniv, Sağlık Bilimleri Enst, Doktora Tezi, Ankara, 1991.
- Irmak K, Şahal M: Buzağılarda deneysel cryptosporidiosis'de klinik bulgular ve sağaltım. *Turk J Vet Anim Sci*, 17: 81-88, 1993.
- Jex AR, Smith HV, Monis PT, Campbell BE, Gasser RB: *Cryptosporidium* – Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotech Adv*, 26: 304-317, 2008.
- Jiang J, Alderisio KA, Xiao L: Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl Environ Microbiol*, 71(8): 4446-4454, 2005.
- Karaer Z, Dumanlı N: Genel Protozooloji. İçinde: Dumanlı N, Karaer Z (Eds): *Veteriner Protozooloji*. P. 1-21. Medisan Yay, Ankara, 2010.

- Kehl KS, Cicirello H, Havens PL: Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J Clin Microbiol*, 33(2): 416-418, 1995.
- Keshavarz A, Haghighi A, Athari A, Kazemi B, Abadi A, Mojarad EN: Prevalence and molecular characterisation of bovine *Cryptosporidium* Qazvin province, Iran. *Vet Parasitol*, 160(3-4): 316-318, 2009.
- Kissinger JC: Genomics. In: Fayer R, Xiao L (Eds): *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. p. 43–56. CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
- Kvac M, Kouba M, Vitovec J: Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Vet Parasitol*, 137: 202-209, 2006.
- Laurent F, McCole D, Eckmann L, Kagnoff FM: Pathogenesis of *Cryptosporidium* infection. *Microbes Infect*, 2: 141-148, 1999.
- Lassen B, Viltrop A, Raaperi K, Järvis T: *Eimeria* and *Cryptosporidium* in Estonian dairy farms in regard to age, species, and diarrhoea. *Vet Parasitol*, 166:(3-4) 212-219, 2009.
- Lefay D, Naciri M, Poirier P, Chermette R: Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. *Vet Parasitol*, 89: 1-9, 2000.
- Levine ND: *Veterinary Protozoology*. Iowa State University Press, USA. p. 413, 1985
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J: *Brock Biology of Microorganisms*. 8nd ed. International Edition. Prentice Hall, 524-526, 1997.
- Mamak N, Özçelik S, Değerli S, Oğuztürk H, Akın Z: Zara (Sivas) yöresi sığırlarında *Cryptosporidium* infeksiyonunun prevalansı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 24: 401-404, 2000.
- McAllister TA, Olson ME, Fletch A, Wetzstein M and Entz T: Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in beef cows in Southern Ontario and in beef cows in Southern British Columbia. *Can Vet J*, 46: 47-55, 2005.
- Mıstık R, Helvacı S, Akdiş C, Töre O: Bursa yöresinde sağlıklı ve diareli kişilerde *Cryptosporidium* araştırması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 16(2): 1-5, 1992.
- Nazemalhosseini-Mojarad E, Haghighi A, Taghipour N, Keshavarz A, Mohebi SR, Zali MR, Xiao L: Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and

- Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. *Vet Parasitol*, 179: 250-252, 2011.
- Nichols G: Epidemiology. In: Fayer R, Xiao L (Eds): *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. p. 79–118. CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
- O’Handley RM, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Morck DW, Olson ME: Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *JAVMA*, 214 (3): 391-396, 1999.
- O’Handley RM, Olson ME: Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Vet Clin Food Anim*, 22 (3): 623-643, 2006.
- O’Hara SP, Chen XM: The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microb Infect*, 13(8-9): 721-730, 2011.
- Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E: Dışkı İnceleme Yöntemleri. In: Özcel MA, Altıntaş N (Eds): *Parazit Hastalıklarında Tanı*. s. 1-61 Türkiye Parazitol Dern Yay, No. 15, 1997.
- Olson ME, O’Handley RM, Ralston BJ, McAllister TA Thomson RCA: Update on cryptosporidiosis in cattle. *Trends in Parasitol*. 20: 185-191, 2004.
- Özer E, Erdoğan SZ, Köroğlu E: Elazığ yöresinde buzağı ve kuzularda bulunan *Cryptosporidium*’ un yayılışı üzerinde araştırmalar. *Turk J Vet Anim Sci*, 14: 439-445, 1990.
- Özcel MA, Üner A, Ertuğ S: Immunofloresans Yöntemi. In: Özcel MA, Altıntaş N (Ed): *Parazit Hastalıklarında Tanı*. s. 215–240. Türkiye Parazitol Dern Yay, No: 15, 1997.
- Özlem MB, Eren H, Kaya O: Aydın yöresi buzağılarda *Cryptosporidium*’ların varlığının araştırılması. *Bornova Vet Kontr Araş Enst Derg*, 22: 15-22, 1997.
- Paul S, Chandra D, Ray DD, Tewari AK, Rao JR, Banarje PS, Baidya S, Raina OK: Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* isolates in India. *Vet Parasitol*, 153: 143-146, 2008.
- Plutzer J, Karanis P: Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Vet Parasitol*, 146: 357-362, 2007.
- Ramirez NE, Ward LA, Sreevatan S: A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in human and animals. *Microbes Infect*, 6: 773-785, 2004.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.
- Santin M, Trout JM, Livestock. In: Fayer R, Xiao L (Eds): *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. p. 451–483. CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
- Santin M, Trout JM, Fayer R: A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet Parasitol*, 155: 15-23, 2008.
- Santin M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R: Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet Parasitol*, 122:103-117, 2004.
- Sarı B, Aktaş MS, Arslan MÖ: Erzurum yöresinde buzağlarda *Cryptosporidium* türlerinin prevalansı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 32(2): 116–119, 2008.
- Sarı B, Arslan MÖ, Gıcık Y, Kara M, Taşçı GT: The prevalence of *Cryptosporidium* species in diarrhoeic lambs in Kars province and potential risk factors. *Trop Anim Health Prod*, 41: 819-821, 2009.
- Sarıkaya R: *Cryptosporidium* türlerinin tanımlanmasında yeni bir yaklaşım. Ribotiplendirme. *Gazi Üniv Kırşehir Eğitim Fak*, 5(2): 13-26, 2004.
- Sears CL, Kirkpatrick BD: Cryptosporidiosis and isosporiasis. In, *Principles and Practice of Clinical Parasitology*. John Wiley&Sons Ltd. Prees. p. 139-164, 2001.
- Sevinc F, Irmak K, Sevinc M: The prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in the diarrhoeic and non-diarrhoeic calves. *Revue Med Vet*, 154: 357-361, 2003.
- Sevinç F, Uslu U, Derinbay Ö: The prevalence of *Cryptosporidium parvum* in lambs around Konya. *Türk J Vet Anim Sci*, 29: 1191-1194, 2005.
- Silverlas C, Emanuelson U, de Verdier K, Björkman C: Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. *Prev Vet Med*, 90: 242–253, 2009.
- Singh BB, Sharma R, Kumar H, Banga H.S, Aulakh RS, Gill JPS, Sharma JK: Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Vet Parasitol*, 140: 162-165, 2006.

- Smith H: Diagnostics. In: Fayer R, Xiao L (Eds): *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. p. 173–207. CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
- SPSS: SPSS for Windows, Release 6.0, Copyright (SPSS inc 1989-1999), 27 octt 1999.
- Sreter T, Varga I: Cryptosporidiosis in birds-A review. *Vet Parasitol*, 87: 261-279, 2000.
- Starkey SR, Kimber KR, Wade SE, Schaaf SL, White ME, Mohammed HO: Risk factors associated with *Cryptosporidium* infection on dairy farms in a New York State Watershed. *J Dairy Sci*, 89: 4229–4236, 2006.
- Starling CR, Arrowood MJ: Cryptosporidia. In parasitic protozoa. Academic Prees, 65(6): 159-224, 1993.
- Stockdale HD, Spencer JA ve Blagburn BL: Prophylaxis and Chemotherapy. In: Fayer R, Xiao L (Eds): *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. p. 255–279. CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
- Sungur T, Kar S, Güven E, Aktaş M, Karaer Z, Vatansever Z: *Cryptosporidium* spp'nin dışkıdan nested-PCR ve carbol fuchsin boyama yöntemi ile teşhis edilmesi. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 32(4): 305-308, 2008.
- Şahal M, Karaer Z, Yaşa D S, Çizmeçi S, Tanyel B: Cryptosporidiosis in newborn calves in Ankara region: clinical, haematological findings and treatment with Lasalocid-NA. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 112: 203-208, 2005.
- Şimşek AT, İnci A, Yıldırım A, Çiloğlu A, Bişkin Z, Düzlü Ö: Nevşehir yöresinde ishalleri buzağılarda *Cryptosporidium* türlerinin moleküler prevalansı ve karakterizasyonu. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi SB03-06, s. 158, 5-10 Eylül 2011, Kars.
- Tanrıverdi S: *Cryptosporidium*'un genotiplendirilmesi ve enfeksiyon kaynaklarının araştırılmasında kullanımı. In: Aslan G, Emektaş G, Köksal F, Serin S. (Eds): 4.Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu, Uygulamalı Moleküler Kurs Kitabı. s. 126-148. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını. No:51, 16-20 Mayıs, Mersin 2005.
- Tanrıverdi S, Arslan MÖ, Akiyoshi D.E, Tzipori S, Widmer G: Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. *Mol Biochem Parasitol*, 130(1): 13-22, 2003.

- Tanrıverdi S, Markovics A, Arslan MÖ, İtik A, Shkap V, Widmer G: Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. *Appl Environ Microbiol*, 72(4): 2507-2513, 2006.
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL: *Veterinary Parasitology*. 4th ed. Blackwell Publishing, 2007.
- Terzi G: Gıda kaynaklı protozoon enfeksiyonların insan sağlığı açısından önemi. *Yüzüncü Yıl Üniv Vet Fak Derg*, 16(2): 47-55, 2005.
- Thoma L, Kuhis MD: Cryptosporidiosis during childhood. *Semin Pediatr Infect Dis*, 11(3): 213-219, 2000.
- Thompson HP, Dooley JS, Kenny J, McCoy M, Lowery CJ, Moore JE, Xiao L: Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitol Res*, 100(3): 619-624, 2007.
- Thompson RCA, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijjawi NS: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv Parasitol*, 59: 77-158, 2005.
- Trotz-Williams LA, Martin SW, Martin D, Duffield T, Leslie KE, Nydam DV, Jamieson F, Peregrine AS: Multiattribute evaluation of two simple tests for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf faeces. *Vet Parasitol*, 134: 15-23, 2005.
- Trotz-Williams LA, Martin SW, Leslie KE, Duffield T, Nydam DV, Peregrine AS: Association between management practices and within-herd prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding on dairy farms in Southern Ontario. *Prev Vet Med*, 83: 11-23, 2008
- Truong Q, Ferrari BC: Quantitative and qualitative comparisons of *Cryptosporidium* faecal purification procedures for the isolation of oocysts suitable for proteomic analysis. *Int J Parasitol*, 36(7): 811-9, 2006.
- Tüzer E, Toparlak, M: *Veteriner Protozooloji*. İst Üniv Vet Fak Yayını. Ders Notu No:105, İstanbul, 1999.
- Tzipori S, Ward H: Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect*, 4: 1047-1058, 2002.
- Uga S, Matsuo J, Kono E, Kimura K, Inoue M, Rai SK, Ono K: Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocyst shedding in calves in Japan. *Vet Parasitol*, 94: 27-32, 2000.

- Üner A, Tanrıverdi S, Caner A, Değirmenci A: *Cryptosporidium*'larda Moleküler Biyolojik Yapı ve Çalışmalar. In: Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H (Eds): Moleküler Parazitoloji. s. 631-64. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın, No:22, 2007.
- Yetkin MA: İmmun Yetmezlikli hastalarda enterik patojen olarak *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılması. Gazi Üniv, Tıp Fak Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları ABD, Uzmanlık Tezi, 1998.
- Zajac AM, Conboy GA: Veterinary Clinical Parasitology. 8nd ed. John Wiley and Sons, Inc, 2012.
- Wyatt CR, Riggs MW, Fayer R: Cryptosporidiosis in neonatal calves. Vet Clin Food Anim, 26: 89-103, 2010.
- Wielinga PR, Vries A, Goot TH, Mank T, Mars MH, Koortbeek LM, Giessen JWB: Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in the Netherlands. Int J Parasitol, 38: 809-817, 2008.
- Xiao L: Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. Exp Parasitol, 124: 80–89, 2010.
- Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Faye R, Lal AA: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl Environ Microbiol, 65(4): 1578-1583, 1999.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ: *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin Microbiol Rew. 17(1): 72-97, 2004.
- Xiao L, Ryan UM: Molecular Epidemiology. In: Fayer R, Xiao L (Eds): *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. p. 119–172. CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
- Xiao L, Zhou L, Santin M, Yang W, Fayer R: Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. Parasitol Res, 100 (4): 701-706, 2007.
- Xu P, Widmer G, Wang Y, Ozaki LS, Alves JM, Serrano MG, Puiu D, Manque P, Akiyoshi D, Mackey AJ, Pearson WR, Dear PH, Bankier AT, Peterson D.L, Abrahamsen MS, Kapur V, Tzipori S, Buck GA: The genome of *Cryptosporidium hominis*. Nature, 431: 1107-112, 2004.

ÖZGEÇMİŞ

Kars ili 1973 doğumlu olup, ilk ve orta öğrenimini Kars'ta, lise öğrenimini ise Konya Karatay lisesinde 1990 yılında tamamladı. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1996 yılında mezun oldu. Kafkas Üniversitesi Kars Meslek Yüksek Okulu Arıcılık Bölümüne Öğretim Görevlisi olarak 1997 yılında atandı. 2004 yılında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Halen Kafkas Üniversitesi Kars Meslek Yüksek Okulu Veterinerlik Bölümü, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı'nda Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir. Evli ve bir kız çocuk annesidir.