

**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAYSERİ’NİN MAHZEMİN YÖRESİNDEKİ  
SIĞIRLARDA COCCIDIOSIS’E YOL AÇAN PATOJENİK  
EIMERIA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER PREVALANSI VE  
FİLOGENETİK KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan  
Muzaffer HATIRNAZ**

**Danışman  
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma TÜBİTAK ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma  
Projeleri Birimi tarafından sırasıyla 113 O 597 ve TYL-2014-5174 nolu  
proje ile desteklenmiştir.**

**Kasım 2015  
KAYSERİ**

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

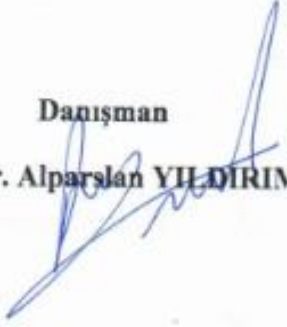
**Adı-Soyadı: Vet. Hek. Muzaffer HATIRNAZ**

**İmza :**



## YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Kayseri’nin Mahzemin Yöresindeki Sığırlarda Coccidiosis’e Yol Açan Patojenik *Eimeria* Türlerinin Moleküler Prevalansı ve Filogenetik Karakterizasyonu”, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

|                                                                                     |                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |
| Tezi Hazırlayan                                                                     | Danışman                                                                              |
| Vet. Hek. Muzaffer HATIRNAZ                                                         | Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM                                                          |
|  |                                                                                       |
| Anabilim Dalı Başkanı                                                               |                                                                                       |
| Prof. Dr. Abdullah İNCİ                                                             |                                                                                       |

**Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM** danışmanlığında **Vet. Hek. Muzaffer HATIRNAZ** tarafından hazırlanan “**Kayseri’nin Mahzemin Yöresindeki Sığırlarda Coccidiosis’e Yol Açan Patojenik *Eimeria* Türlerinin Moleküler Prevalansı ve Filogenetik Karakterizasyonu**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Parazitoloji** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

20/11/2015

JÜRİ :

İmza

Danışman : Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM (Vet. Fak. Parazitoloji AD)

Üye: Prof. Dr. Abdullah İNCİ (Vet. Fak. Parazitoloji AD)

Üye : Doç. Dr. Zafer PEKMEZCİ (Vet. Fak. Su Ürünleri Hastalıkları AD)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 5.12.2015 tarih ve 906 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR



## TEŞEKKÜR

Başta tez konumun seçilmesinden çalışmalarımın yürütülmesine kadar her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda sonsuz desteğiyle gelişmeme katkıda bulunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Parazitoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladığım günden bu yana desteğini gördüğüm Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdullah İNCİ'ye, saha ve laboratuvar çalışmalarım esnasında her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen öğretim elemanları Doç. Dr. Önder DÜZLÜ, Dr. Zuhale ÖNDER ve Araş. Gör. Arif ÇİLOĞLU'na, çalışma materyalimin toplanmasına yardımcı olan veteriner hekim arkadaşlarıma, laboratuvar çalışmalarına yardımcı olan yüksek lisans öğrencileri Biyolog Zekiye KOÇER, Vet. Hek. Gamze YETİŞMİŞ, Biyolog Gözde ŞAHİNGÖZ'e ve çalışma süresince malzeme bazında 113 O 597 ve TYL-2014-5174 kodlu projeler ile destek sağlayan TÜBİTAK ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın her aşamasında birçok fedakârlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan sevgili eşime ve yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için aileme teşekkürü borç bilirim.

**KAYSERİ’NİN MAHZEMİN YÖRESİNDEKİ SIĞIRLARDA COCCIDIOSIS’E  
YOL AÇAN PATOJENİK *EIMERIA* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER  
PREVALANSI VE FİLOGENETİK KARAKTERİZASYONU**

**T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi, Kasım 2015  
Danışman: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

## ÖZET

Bu çalışma, Kayseri’nin mahzemin yöresinde sığırlarda coccidiosis’e yol açan *Eimeria* türlerinin moleküler prevalansı ve filogenetik karakterizasyonunu ortaya koymak amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla 2014 yılında araştırma yöresinde halk elinde süt ve besi sığırcılığı yapılan 23 ahırdan farklı yaş, cinsiyet ve ırklara ait toplam 150 sığır incelenmiştir. Sığırlardan tekniğine uygun şekilde alınan dışkı örnekleri laboratuvarında *Eimeria* ookistleri yönünden incelenmiş ve pozitif örneklerde gram dışkıdaki ookist sayısı (OPG) belirlenmiştir. Pozitif belirlenen sığırlara ait dışkı örnekleri sporlandırma prosedürüne tabii tutulup ookist morfolojisine göre *Eimeria* türlerinin teşhisleri yapılmıştır. *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen örneklerle ait genomik DNA izolatları patojenik *Eimeria* türlerinin kantitatif identifikasyonu için Real Time PCR analizlerine tabii tutulmuştur. Morfolojik identifikasyon ve Real Time PCR analizleri temelinde belirlenen patojenik *Eimeria* türlerine ait izolatların 18S rRNA gen bölgeleri amplifiye edilmiş ve sonrasında klonlama, plazmid pürifikasyonu ve sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Nükleotid dizileri saptanan izolatların moleküler karakterizasyonları belirlendikten sonra GenBank aksesyonları (KU052223-37) sağlanmış ve filogenetik yapılanmaları belirlenmiştir. İncelemesi yapılan sığırlardan 98’i (%65,3) *Eimeria* ookistleri yönünden pozitif bulunmuştur. *Eimeria* pozitifliğinin sığırların yaş, cinsiyet, ırk ve dışkı karakterlerine göre dağılımında istatistiksel bir farklılık belirlenmemiştir ( $p>0,05$ ). Pozitif belirlenen sığırlarda ortalama OPG değeri  $883,8 \pm 1166,2$  belirlenmiştir. OPG değerleri <3ay ve 4-12 ay yaş grupları ile kanlı ishalli ve ishalli dışkı karakteri gruplarında istatistiksel anlamda daha yüksek düzeyde saptanmıştır. Pozitif örneklerde morfolojik identifikasyon sonucunda en yaygın tür %76,5 ile *E. bovis* bulunmuş bunu sırasıyla %64,3 ile *E. zuernii*, %51,0 ile *E. auburnensis*, %44,9 ile *E. alabamensis*, %16,3 ile *E. cylindrica*, %6,1 ile *E. bukidnonensis* ve %4,1 ile *E. subspherica* izlemiştir. Patojenik türler için Real Time PCR analizleri sonucunda DNA kopya sayısı düzeyinde

en yüksek pozitiflik *E. bovis* için belirlenmiş bunu sırasıyla *E. zuernii*, *E. auburnensis* ve *E. alabamensis* izlemiştir. <3 ay grubu ve ishalli dışkı karakterinde olan örneklerde *E. bovis* ve *E. zuernii* pozitifliği de DNA kopya sayısı düzeyinde *E. auburnensis* ve *E. alabamensis* pozitifliklerine oranla daha yüksek belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). 18S rRNA gen bölgesi filogenetik analiz sonuçlarına göre araştırma yöresinde belirlenen *E. zuernii*, *E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis*, *E. cylindrica* ve *E. bukidnonensis* türlerine ait izolatların Japonya'dan bildirilen izolatlarla birlikte 3 monofiletik grupta tür bazlı olarak kümelendikleri saptanmıştır. Belirlenen izolatlar ve aynı türe ait Japonya izolatları arasında farklı oranlarda (%0,0-0,7) intraspesifik sekans heterojenitesi belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Kayseri'nin Mahzemin yöresindeki sığırlarda coccidiosis'e yol açan *Eimeria* türlerinin moleküler prevalansı ve enfeksiyon yükleri kantitatif düzeyde ortaya konmuş ve patojenik türlerin filogenetik karakterizasyonları sağlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Sığır, Coccidiosis, Real Time PCR, Moleküler prevalans, Filogenetik Karakterizasyon

**MOLECULAR PREVALENCE AND PHYLOGENETIC  
CHARACTERIZATION OF PATHOGENIC *EIMERIA* SPECIES, WHICH  
CAUSE BOVINE COCCIDIOSIS IN MAHZEMİN AREA OF KAYSERİ**

**Erciyes University, Graduate School of Health Science  
Department of Veterinary Parasitology  
M.Sc. Thesis, November 2015  
Supervisor: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

**ABSTRACT**

This study was conducted to determine the molecular prevalence and phylogenetic characterization of *Eimeria* species that cause bovine coccidiosis in Mahzemin district of Kayseri. For this aim in year 2014, 150 cattle belong to different ages, gender and breed were sampled from 23 barns in which the cattle were raised for milk and food production by local folk. Techniqually collected fecal samples from cattle were investigated in terms of *Eimeria* ookists at the laboratory and ookists per gram of feces (OPG) were calculated in the positive samples. Species identifications of *Eimeria* ookists were performed after the sporulation of the ookists in fecal samples from positive cattle. Real Time PCR analyses were carried out on the genomic DNA isolates from the samples positive with *Eimeria* ookists in order to quantitative identification of pathogenic *Eimeria* species. 18S rRNA gene regions of the isolates belong to the *Eimeria* species, which were determined on the base of morphological identification, and Real Time PCR analyses were amplified. Afterwards cloning, plasmid purification and sequence analyses were performed. After the the molecular characterization of the isolates in which the nucleotide sequences were determined, GenBank accessions were provided (KU052223-37) and phylogenetic constructions were obtained. 98 (65.3%) out of examined cattle were found to be positive with *Eimeria* ookists. No statistically importance was determined ( $p>0.05$ ) in the distribution of *Eimeria* positivity over the age, gender, breed and feces structure of the infected cattle. The mean OPG was determined as  $883.8\pm1166.2$  in the positive cattle. The OPG values were found to be statistically higher in the <3 month and 4-12 month age groups and also in bloody diarrrheaoic and diarrrheaoic groups. According to the morphological identification results of the positive samples, *E. bovis* was found to be the most prevalent species with the ratio of 76.5% and this was followed by *E. zuernii*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis*, *E. cylindrica*, *E. bukidnonensis* and *E. subspherica* with the ratios of 64.3%, 51.0%, 44.9%, 16.3%, 6.1% and 4.1%, respectively. The Real Time PCR

assay results for pathogenic species revealed that *E. bovis* was the species with the maximum positivity and this was followed by *E. zuernii*, *E. auburnensis* and *E. alabamensis* on the base of DNA copy number. The *E. bovis* and *E. zuernii* positivities in the 3 month and diarrheoic groups were determined higher than the positivities for *E. auburnensis* and *E. alabamensis* based DNA copy number level and this difference was found statistically important ( $p < 0.05$ ). According to the 18S rRNA phylogenetic analyses results, the isolates determined in the research area and belong to *E. zuernii*, *E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis*, *E. cylindrica* and *E. bukidnonensis* species along with the Japanese isolates were placed in 3 monophyletic groups and clustered on the basis of species. Intraspecific sequence heterogeneity with different rates (0.0-0.7%) among the determined isolates and the Japanese isolates were determined.

In conclusion, the molecular prevalence and quantitative infection loads of *Eimeria* species that cause bovine coccidiosis in the Mahzemin district of Kayseri were revealed and phylogenetic characterizations of pathogenic species were provided with this study.

**Key words:** Cattle, Coccidiosis, Real Time PCR, Molecular prevalence, Phylogenetic Characterization

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------|------|
| İÇ KAPAK.....                                                 | i    |
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....                                  | ii   |
| YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....                                 | iii  |
| TEŞEKKÜR.....                                                 | v    |
| ÖZET.....                                                     | vi   |
| ABSTRACT.....                                                 | viii |
| İÇİNDEKİLER .....                                             | x    |
| TABLolar LİSTESİ.....                                         | xiii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                        | xvi  |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                        | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                        | 2    |
| 2.1 SIĞIRLARDA <i>EIMERIA</i> TÜRLERİNİN TAKSONOMİSİ.....     | 2    |
| 2.2 SIĞIRLARDA <i>EIMERIA</i> TÜRLERİNİN MORFOLOJİSİ .....    | 3    |
| 2.3 SIĞIRLARDA <i>EIMERIA</i> TÜRLERİNİN BİYOLOJİSİ.....      | 3    |
| 2.4 SIĞIRLARDA <i>EIMERIA</i> TÜRLERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ..... | 5    |
| 2.4.1 Coccidiosis'in Türkiye'deki Yayılışı .....              | 8    |
| 2.4.2 Coccidiosis'in Dünyadaki Yayılışı.....                  | 9    |
| 2.5 SIĞIR COCCIDIOSIS'İNDE KLİNİK VE PATOGENEZ .....          | 9    |
| 2.6 SIĞIR COCCIDIOSIS'İNDE TANIL.....                         | 13   |
| 2.6.1 Konvansiyonel Morfolojik Tanı.....                      | 13   |
| 2.6.2 Serolojik Tanı .....                                    | 14   |
| 2.6.3 Ayırıcı Tanı .....                                      | 15   |
| 2.7 SIĞIR COCCIDIOSIS'İNDE TEDAVİ .....                       | 15   |

|       |                                                                                    |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.8   | SIĞIR COCCIDIOSIS'İNDE KORUNMA VE KONTROL .....                                    | 16 |
| 2.9   | SIĞIR <i>EIMERIA</i> TÜRLERİ ÜZERİNE MOLEKÜLER VE FİLOGENETİK ÇALIŞMALAR.....      | 18 |
| 3.    | GEREÇ VE YÖNTEM .....                                                              | 21 |
| 3.1   | SAHA ÇALIŞMALARI .....                                                             | 21 |
| 3.1.1 | Araştırma Sahası ve Dışkı Örneklerinin Toplanması.....                             | 21 |
| 3.2   | LABORATUVAR ÇALIŞMALARI .....                                                      | 22 |
| 3.2.1 | Konvansiyonel Dışkı Muayenesi.....                                                 | 22 |
| 3.2.2 | Gram Dışkıdaki Ookist Sayısının (OPG) Belirlenmesi.....                            | 23 |
| 3.2.3 | <i>Eimeria</i> Ookistlerinin Sporlandırılması ve Tür Teşhisleri .....              | 23 |
| 3.2.4 | Dışkı Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu .....                                   | 24 |
| 3.2.5 | Ribosomal RNA Internal Transcribed Spacer 1 (ITS-1) Geninin Amplifikasyonu.....    | 26 |
| 3.2.6 | Patojenik <i>Eimeria</i> Türleri için TaqMan Real Time PCR Analizleri .....        | 27 |
| 3.2.7 | 18S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu .....                                       | 28 |
| 3.2.8 | 18S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması ve Plazmid DNA izolasyonu .....                | 29 |
| 3.2.9 | 18S rRNA Gen Bölgesinin Sekans ve Filogenetik Analizi.....                         | 32 |
| 3.3   | İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....                                                         | 32 |
| 4.    | BULGULAR .....                                                                     | 23 |
| 4.1   | KONVANSİYONEL DIŞKI MUAYENESİ SONUÇLARI.....                                       | 23 |
| 4.2   | GRAM DIŞKIDAKİ OOKİST SAYISI (OPG) VE İSTATİSTİKSEL ANALİZİ .....                  | 38 |
| 4.3   | MORFOLOJİK İDENTİFİKASYON SONUÇLARI.....                                           | 45 |
| 4.4   | PATOJENİK <i>EIMERIA</i> TÜRLERİ İÇİN RİBOSOMAL ITS-1 GENİNİN AMPLİFİKASYONU ..... | 48 |
| 4.5   | PATOJEN TÜRLER İÇİN REAL TIME PCR SONUÇLARI.....                                   | 48 |

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.6 18S rRNA GEN BÖLGESİNİN AMPLİFİKASYON VE SEKANS ANALİZİ<br>SONUÇLARI..... | 68 |
| 4.7 18S rRNA GEN BÖLGESİNİN FİLOGENETİK ANALİZ SONUÇLARI .....                | 72 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....                                                     | 80 |
| 6. KAYNAKLAR.....                                                             | 86 |
| EKLER.....                                                                    | 93 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                | 94 |

## TABLOLAR LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2.1 Sığırlarda <i>Eimeria</i> türlerinin taksonomideki yeri .....                                                                                                          | 2  |
| Tablo 2.2 Sığırlarda coccidiosis tedavisinde kullanılan anticoccidial ilaçlar .....                                                                                              | 15 |
| Tablo 3.1 Kayseri'nin Mahzemin yöresinde örneklenen sığırların yaş, cinsiyet ve ırklarına göre dağılımları .....                                                                 | 21 |
| Tablo 3.2 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için primer ve prob sekansları .....                                                                                                  | 27 |
| Tablo 4.1 <i>Eimeria</i> ookistleri ile pozitif belirlenen örneklerin sığırların yaş, cinsiyet ve ırkı ile dışkı karakterine göre dağılımları .....                              | 34 |
| Tablo 4.2 Yaş gruplarına göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin istatistiksel analizi .....                                                                                          | 35 |
| Tablo 4.3 Sığırların cinsiyetine göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin istatistiksel analizi.....                                                                                   | 36 |
| Tablo 4.4 Sığırların ırkına göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin istatistiksel analizi.....                                                                                        | 37 |
| Tablo 4.5 Dışkı karakterine göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin istatistiksel analizi .....                                                                                       | 38 |
| Tablo 4.6 <i>Eimeria</i> ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımı .....                                                        | 39 |
| Tablo 4.7 Sığırlarda OPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımının istatistiksel analizi.....                                                                                 | 40 |
| Tablo 4.8 <i>Eimeria</i> ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımı .....                                                             | 41 |
| Tablo 4.9 Sığırlarda OPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımının istatistiksel analizi.....                                                                                 | 41 |
| Tablo 4.10 <i>Eimeria</i> ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin ırka göre dağılımı .....                                                                 | 42 |
| Tablo 4.11 Sığırlarda OPG değerlerinin ırka göre dağılımının istatistiksel analizi .....                                                                                         | 43 |
| Tablo 4.12 <i>Eimeria</i> ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımı .....                                                 | 44 |
| Tablo 4.13 Sığırlarda OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımının istatistiksel analizi .....                                                                         | 45 |
| Tablo 4.14 Pozitif örneklerde saptanan <i>Eimeria</i> türleri ve prevalansları.....                                                                                              | 47 |
| Tablo 4.15 <i>Eimeria</i> ookistleri ile pozitif saptanan örneklere ait genomik DNA izolatlarının patojenik <i>Eimeria</i> türleri yönünden TaqMan Real Time PCR sonuçları ..... | 49 |

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 4.16 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. bovis</i> Ct (dR) değerleri .....                                  | 50 |
| Tablo 4.17 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. bovis</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi.....          | 51 |
| Tablo 4.18 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. bovis</i> Ct (dR) değerleri .....                               | 52 |
| Tablo 4.19 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. bovis</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi.....       | 53 |
| Tablo 4.20 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. zuernii</i> Ct (dR) değerleri.....                                 | 53 |
| Tablo 4.21 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. zuernii</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi.....        | 54 |
| Tablo 4.22 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. zuernii</i> Ct (dR) değerleri.....                              | 55 |
| Tablo 4.23 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. zuernii</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi.....     | 56 |
| Tablo 4.24 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. auburnensis</i> Ct (dR) değerleri .....                            | 56 |
| Tablo 4.25 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. auburnensis</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi.....    | 57 |
| Tablo 4.26 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. auburnensis</i> Ct (dR) değerleri .....                         | 58 |
| Tablo 4.27 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. auburnensis</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi..... | 58 |
| Tablo 4.28 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. alabamensis</i> Ct (dR) değerleri.....                             | 59 |
| Tablo 4.29 Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen <i>E. alabamensis</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi.....    | 60 |
| Tablo 4.30 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. alabamensis</i> Ct (dR) değerleri.....                          | 61 |
| Tablo 4.31 Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen <i>E. alabamensis</i> Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi..... | 62 |
| Tablo 4.32 <3 ay yaş grubu örneklerde patojenik <i>Eimeria</i> türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri .....            | 62 |
| Tablo 4.33 4-12 ay yaş grubu örneklerde patojenik <i>Eimeria</i> türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri .....          | 64 |
| Tablo 4.34 >12 ay yaş grubu örneklerde patojenik <i>Eimeria</i> türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri .....           | 65 |

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 4.35 Kanlı ishalli dışkı grubu örneklerde patojenik <i>Eimeria</i> türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri..... | 66 |
| Tablo 4.36 İshalli dışkı grubu örneklerinde patojenik <i>Eimeria</i> türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri .....    | 67 |
| Tablo 4.37 Normal dışkı grubu örneklerinde patojenik <i>Eimeria</i> türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri .....     | 68 |
| Tablo 4.38 Klonlama ve plazmid pürifikasyonuna tabii tutulan genomik DNA izolatları .....                                   | 69 |
| Tablo 4.39 Sekanslanan <i>Eimeria</i> izolatlarının tür, incelenen gen bölgesi ve GenBank aksesyon numaraları .....         | 70 |
| Tablo 4.40 <i>Eimeria</i> izolatlarının 18S rRNA gen bölgesine göre ikili hizalama sonuçları.....                           | 73 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1 Sığırlarda görülen <i>Eimeria</i> türlerinin ookist ve sporocystlerinin morfolojik özellikleri .....                                                        | 3  |
| Şekil 2.2 <i>E. bovis</i> 'in biyolojik döngüsü .....                                                                                                                 | 5  |
| Şekil 3.1 Araştırma merkezi .....                                                                                                                                     | 21 |
| Şekil 3.2 Araştırma yöresinde toplanan sığır dışkı örnekleri .....                                                                                                    | 22 |
| Şekil 3.3 Sporlandırmaya alınan dışkı örnekleri .....                                                                                                                 | 24 |
| Şekil 3.4 pJET1.2/blunt cloningvector haritası .....                                                                                                                  | 30 |
| Şekil 3.5 LB katı besi yerinde üreyen koloniler .....                                                                                                                 | 31 |
| Şekil 3.6 Kolonilerin LB sıvı besi yerinde üretilmesi .....                                                                                                           | 31 |
| Şekil 4.1 Dışkı örneklerinde <i>Eimeria</i> ookistleri .....                                                                                                          | 23 |
| Şekil 4.2 Sığırların yaş gruplarına göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin dağılımı .....                                                                                 | 35 |
| Şekil 4.3 Sığırların cinsiyetine göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin dağılımı .....                                                                                    | 36 |
| Şekil 4.4 Sığırların ırkına göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin dağılımı .....                                                                                         | 37 |
| Şekil 4.5 Sığırlarda dışkı karakterine göre <i>Eimeria</i> pozitifliğinin dağılımı .....                                                                              | 38 |
| Şekil 4.6 OPG değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği.....                                                                                        | 40 |
| Şekil 4.7 OPG değerlerinin sığırların cinsiyetine göre dağılım grafiği .....                                                                                          | 41 |
| Şekil 4.8 OPG değerlerinin sığırların ırkına göre dağılım grafiği .....                                                                                               | 43 |
| Şekil 4.9 OPG değerlerinin sığırların dışkı karakterlerine göre dağılım grafiği.....                                                                                  | 45 |
| Şekil 4.10 Pozitif örneklerde <i>Eimeria</i> ookistleri, 1. ....                                                                                                      | 46 |
| Şekil 4.11 Pozitif örneklerde <i>Eimeria</i> ookistleri, 2. ....                                                                                                      | 46 |
| Şekil 4.12 Pozitif örneklerde <i>Eimeria</i> türlerinin dağılım grafiği.....                                                                                          | 47 |
| Şekil 4.13 Pozitif örneklerde miks enfeksiyonların dağılım grafiği.....                                                                                               | 47 |
| Şekil 4.14. Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için ITS-1 gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR analizi sonucu amplikonların agaroz jel üzerinde görünümü..... | 48 |
| Şekil 4.15 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri yönünden pozitif belirlenen bazı örneklerin Real Time PCR'da belirlenen amplifikasyon eğrileri.....                       | 49 |
| Şekil 4.16 <i>E. bovis</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği .....                                                    | 51 |
| Şekil 4.17 <i>E. bovis</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği ...                                                   | 52 |

|                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.18 <i>E. zuernii</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği ....                                                                                                                | 54 |
| Şekil 4.19 <i>E. zuernii</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği                                                                                                                  | 55 |
| Şekil 4.20 <i>E. auburnensis</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği .....                                                                                                           | 57 |
| Şekil 4.21 <i>E. auburnensis</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği .....                                                                                                        | 58 |
| Şekil 4.22 <i>E. alabamensis</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği .....                                                                                                           | 60 |
| Şekil 4.23 <i>E. alabamensis</i> için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği .....                                                                                                        | 61 |
| Şekil 4.24 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için <3 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri .....                                                                                   | 63 |
| Şekil 4.25 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için <3 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin türler arasındaki istatistiksel farklılıkları.....                                                                                  | 63 |
| Şekil 4.26 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için 4-12 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri .....                                                                                 | 64 |
| Şekil 4.27 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için >12 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri .....                                                                                  | 65 |
| Şekil 4.28 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için kanlı ishalli dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri.....                                                                          | 66 |
| Şekil 4.29 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için ishalli dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri .....                                                                               | 67 |
| Şekil 4.30 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için ishalli dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin türler arasındaki istatistiksel farklılıkları.....                                                                              | 67 |
| Şekil 4.31 Patojenik <i>Eimeria</i> türleri için normal dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri .....                                                                                | 68 |
| Şekil 4.32 Bazı <i>Eimeria</i> pozitif örneklerle ait izolatların parsiyel 18S subunit (SSU) rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü ..... | 69 |
| Şekil 4.33 Araştırma yöresinde sığırlarda karakterize edilen <i>Eimeria</i> izolatlarının nükleotid sekansları ..                                                                                                                  | 71 |
| Şekil 4.34 <i>Eimeria</i> izolatlarına ait 18S rRNA nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları.....                                                                                                                                | 78 |
| Şekil 4.35 <i>Eimeria</i> izolatlarının 18S rRNA gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri .....                                                                                                                                   | 79 |

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sığır coccidiosis'i tüm dünyada yaygınlık gösteren protozoer bir enfeksiyon olup sığırların ekonomik kayıplara yol açan en önemli hastalıklarından biri olarak nitelendirilmektedir (1). Türkiye'de de sığırlarda *Eimeria* etkenleri oldukça yaygınlık göstermekte olup buzağılarda prevalansın konvansiyonel parazitolojik araştırma sonuçlarına göre %60-90 arasında değiştiği kaydedilmiştir (2). Bu araştırmalarda ookist morfolojisine göre yapılan identifikasyonlarda *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. auburnensis* ve *E. ellipsoidalis* türlerinin en yaygın sığır coccidiosis etkenleri olduğu bildirilmiştir (2, 3). Günümüze kadar dünyada sığır coccidiosis'ine yol açan türler üzerine yapılmış moleküler tabanlı araştırmaların çok sınırlı olduğu, Türkiye'de ise mevcut olmadığı dikkati çekmektedir. Bu proje önerisinde, Kayseri'nin Mahzemin ilçesindeki sığırlarda coccidiosis'e yol açan patojenik *Eimeria* türlerinin konvansiyonel morfolojik ve moleküler tabanlı teknikler ile araştırılması, hastalıktan sorumlu türlerin moleküler epidemiyolojisinin ortaya konması; elde edilecek *Eimeria* türlerine ait izolatların 18S rRNA gen bölgelerinin klonlanması, sonrasında sekanslanması ve filogenetik analizleri ile moleküler karakterizasyonlarının belirlenmesi; çoklu hizalama analizleriyle türler arasında ve tür içindeki filogenetik ilişkilerin saptanması; aynı zamanda dünyadan GenBank'a kaydedilmiş mevcut az sayıdaki izolatla genetik farklılık ve yakınlıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Apicomplexa filumunda yer alan *Eimeria* türleri, çeşitli omurgalı konaklarda yerleşmekte olup tüm dünyada yaygınlık göstermektedir. Günümüze kadar bu soy içerisinde 1700'ün üzerinde tür tarif edilmiştir (1). Bazı *Eimeria* türleri özellikle kanatlı ve ruminantlar olmak üzere çiftlik hayvanlarında tehdit oluşturmakta olup yüksek morbidite ve mortalite ile seyretmektedir (1, 4). Sığırlarda büyük ekonomik kayıplara neden olan coccidiosis özellikle 6 aylıktan küçük buzağı ve 6-12 aylık sığırlarda akut klinik tabloya yol açmaktadır. Hastalık buzağılarda ve özellikle üç haftalıktan üç aylığa kadar olan yaş gruplarında daha yaygın görülürken daha yaşlı hayvanlarda gelişen konkomitant immuniteye bağlı olarak subklinik formda seyretmektedir (1, 5). Bunun yanında hastalık daha yaşlı sığırlarda da verim kayıplarına yol açmaktadır (6, 7).

### 2.1 SIĞIRLARDA *EIMERIA* TÜRLERİNİN TAKSONOMİSİ

Sığırlarda coccidiosis'e yol açan *Eimeria* türlerinin Systema Naturae 2000'e göre sistematikteki yeri Tablo 2.1'de verilmiştir (1, 8).

**Tablo 2.1** Sığırlarda *Eimeria* türlerinin taksonomideki yeri

|                                                                                                                                                                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Sınıflandırma</b>                                                                                                                                                                                                           |
| Superkingdom: Eukaryota                                                                                                                                                                                                        |
| Kingdom: Chromalveolata                                                                                                                                                                                                        |
| Süperfilum: Alveolata                                                                                                                                                                                                          |
| Filum: Apicomplexa                                                                                                                                                                                                             |
| Sınıf: Conoidasida                                                                                                                                                                                                             |
| Takım: Eucoccidiorida                                                                                                                                                                                                          |
| Aile: Eimeriidae                                                                                                                                                                                                               |
| Soy: <i>Eimeria</i>                                                                                                                                                                                                            |
| Tür: <i>E. bovis</i> ,<br><i>E. zuernii</i><br><i>E. auburnensis</i><br><i>E. ellipsoidalis</i><br><i>E. cylindrica</i><br><i>E. alabamensis</i><br><i>E. subspherica</i><br><i>E. illinoisensis</i><br><i>E. brasiliensis</i> |

*E. canadensis*  
*E. pellita*  
*E. wyomingensis*  
*E. bukidnonensis*

## 2.2 SIĞIRLARD A *EIMERIA* TÜRLERİNİN MORFOLOJİSİ

Siğırlarda çok sayıda hastalık etkeni coccidiosis etiyolojisinde tanımlanmasına karşın bunlar arasında *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis*, *E. auburnensis* ve *E. alabamensis* patojen türler olarak kabul edilmektedir. Bu türlerden özellikle de *E. bovis* ve *E. zuernii* buzağılarda klinik coccidiosis'e neden olmaktadır (8, 9).

Siğırlarda bulunan önemli coccidiosis etkenleri ile bu türlere ait bazı morfolojik özellikleri Şekil 2.1’de verilmiştir (1, 8).

|                         | Oocyst           |                 |        |                 |              |     | Sporocyst |                          |     |     |     |
|-------------------------|------------------|-----------------|--------|-----------------|--------------|-----|-----------|--------------------------|-----|-----|-----|
|                         | Genişlik<br>(µm) | Uzunluk<br>(µm) | Şekil  | Renk            | Hücre Duvarı | MP  | OG        | GenişlikXUzunluk<br>(µm) | SG  | SS  | SR  |
| <i>E. alabamensis</i>   | 11-16            | 13-24           | O, P   | Açık sarı       | 1-2          | -   | -         | 4-6 x 10-16              | 1-3 | (x) | x   |
| <i>E. auburnensis</i>   | 20-25            | 32-46           | O, (E) | Renksiz         | 2, kalın     | x   | x         | 6-11 x 15-23             | 1-3 | -   | x   |
| <i>E. bovis</i>         | 17-23            | 23-34           | O, A   | Renksiz         | 2            | (x) | -         | 5-8 x 13-18              | 2   | (x) | (x) |
| <i>E. brasiliensis</i>  | 24-30            | 34-43           | E      | Kahverengi/Sarı | 1-2          | x   | (x)       | 7-10 x 16-22             | 2   | (x) | x   |
| <i>E. bukidnonensis</i> | 33-38            | 47-50           | P      | Kahverengi/Sarı | 1-2          | x   | -         | 9-12 x 12-21             | 2   | (x) | -   |
| <i>E. canadensis</i>    | 20-27            | 28-37           | E      | Renksiz         | 1            | (x) | x         | 6-10 x 15-22             | 2-3 | (x) | (x) |
| <i>E. cylindrica</i>    | 12-15            | 16-27           | E      | Renksiz         | 1            | -   | x         | 4-6 x 12-16              | 1   | -   | x   |
| <i>E. ellipsoidalis</i> | 13-17            | 20-26           | E, (O) | Renksiz         | 1-2          | -   | -         | 7-15 x 9-16              | 2   | (x) | x   |
| <i>E. illinoisensis</i> | 19-22            | 24-29           | E, O   | Renksiz         | 1            | -   | -         | 6-8 x 13-16              | 2   | x   | x   |
| <i>E. pellita</i>       | 26-30            | 36-41           | R, S   | Kahverengi/Sarı | 2            | x   | x         | 7-9 x 17-20              | 2   | x   | x   |
| <i>E. subspherica</i>   | 8-13             | 9-14            | S      | Açık sarı       | 1-2          | -   | -         | 2-5 x 6-10               | 1   | x   | -   |
| <i>E. wyomingensis</i>  | 26-31            | 37-45           | O, P   | Kahverengi/Sarı | 1            | x   | -         | 5 x 7-8                  | 1   | x   | -   |
| <i>E. zuernii</i>       | 13-18            | 15-22           | S, (O) | Renksiz         | 1            | -   | (x)       | 4-8 x 7-14               | 1   | -   | x   |

**Şekil 2.1** Siğırlarda görülen *Eimeria* türlerinin ookist ve sporocystlerinin morfolojik özellikleri. MP: mikropil, OG: Ookist polar granül, OR: Ookist residüsü, SG: Sporozoit globülleri, SS: Sporozoit stieda cisimciği, SR: Sporozoit residüsü, E: elipsoidal, R: Yuvarlak, A: Asimetrik, O: Oval, P: Piriform, S: Küresel

## 2.3 SIĞIRLARD A *EIMERIA* TÜRLERİNİN BİYOLOJİSİ

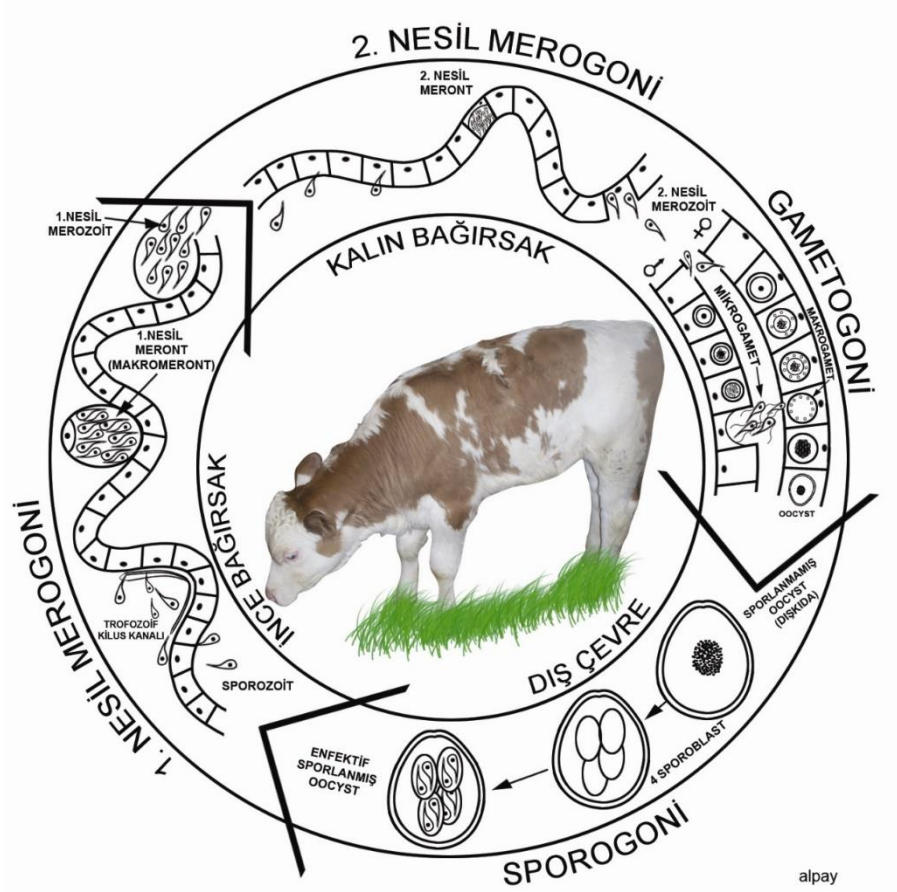
*Eimeria* türleri siğırlarda ince bağırsak epitel hücrelerine yerleşmekte ayrıca sekum ve kolonda da bulunmaktadır. Etkenler barsak epitel hücrelerinde intrasitoplazmik olarak bulunmakta olup, sadece *E. alabamensis* epitel hücre çekirdeği içine yerleşmektedir. Yaşam çemberinde sırası ile merogoni (=şizogoni), gametogoni ve sporogoni çoğalma

dönemleri görülmektedir. Merogoni ve gametogoni konakta bağırsak epitel hücrelerinde, sporogoni ise dış ortamda meydana gelmektedir (8, 10).

Coccidia türleri ile enfekte sığırların dışkılarıyla dışarı atılan sporlanmamış ookistler, ortamda uygun ısı (27-30°C), nem (genellikle %75) ve yeterli oksijen bulunduğunda sporogoni dönemi başlamaktadır. Sporont önce ikiye, daha sonra tekrar ikiye bölünmekte ve 4 adet sporoblast oluşmaktadır. Bu dönemde uzun ovalimsi bir şekil alan parazit, etrafında cidar oluştuktan sonra sporokist adını almaktadır. Sporokist içinde; ikiye bölünme ile muz dilimi şeklinde sporozoitler oluşmaktadır. *Eimeria* türlerinin sporlanmış ookistlerinde toplam 8 adet sporozoit bulunmaktadır. Sığırlarda bulunan coccidia türlerinin sporlanma süresi türlere göre değişmekle beraber, sporlanma süresinin genellikle 2-3 gün olduğu bildirilmektedir. Sporlanmış ookistler enfektif olup, sığırlar bu ookistleri ağız yolu ile aldıklarında enfekte olmaktadır. Sindirim sisteminde asit, enzim, safra, CO<sub>2</sub> gibi kimyasallar ve peristaltik hareketlerin etkisiyle ookistler parçalanmakta ve sporozoitler dışarı çıkmaktadırlar (eksistasyon) (8-10).

Sindirim sisteminde serbest kalan sporozoitler, ince bağırsakların son kısımlarında epitel hücrelerine girmektedirler. *E. bovis* enfeksiyonlarında, bu kısım da lenf kanalı epitel hücrelerinde trofozoitler oluşmaktadır. Daha sonra merogoni dönemi başlamaktadır. *E. bovis* ve *E. zuernii*'nin biyolojisinde 2 nesil merogoni dönemi görülmektedir. Enfeksiyonun 5. gününde 1. nesil merogoni sonucu merontlar (makromerontlar) oluşmaktadır. Merontlar 14-18 gün sonra olgunlaşmakta olup, olgun merontların her biri 120.000 merozoit içermektedirler. Hücrelerin parçalanması ile serbest kalan 1. nesil merozoitler sekum ve kolon epitel hücrelerine girerek 2. nesil merogoniye başlatılmaktadırlar. Hücrelere girişten 2 gün sonra içlerinde 30-36 adet merozoit içeren 2. nesil merontlar oluşmaktadır. Bunların dağılması ile bağırsak boşluğuna 2. nesil merozoitler çıkmaktadır. Merozoitler sekum ve kolon epitel hücrelerine girmekte ve gametositleri oluşturmaktadırlar (gametogoni). Erkek gametositlerin her birinden bir çift kamçılı çok sayıda mikrogamet, dişi gametositlerin her birinden ise bir makrogamet oluşmaktadır. Mikrogametlerde biri makrogametinin içine girerek makrogameti dölemekte (singami) ve zigot oluşmaktadır. Makrogametlerin içinde ve çevresine yakın olarak bir veya iki sıra halinde, mukoprotein içeren eosinofilik plastik granüller dizilmiştir. Bu plastik granüller birleşerek zigotun etrafında bir duvar oluşturmaktadırlar. Etrafı kalın cidarla çevrili bu zigota ookist adı verilmektedir. Bağırsak epitel hücresinin parçalanması

ile serbest kalan ookistler bağırsak boşluğuna düşmekte ve dışkı ile dışarı atılmaktadır (Şekil 2.2) (8, 10).



Şekil 2.2 *E. bovis*'in biyolojik döngüsü (10)

Coccidiosis'de sporlanmış ookistlerin alınmasından 10. gün sonra dışkıda ookistler görülmektedir. Ancak buzağlarda *E. bovis* ve *E. zuernii*'nin oluşturduğu klinik coccidiosis olgularında enfeksiyonun 18-21. günlerinde dışkıda ookistler görülmeye başlamaktadır. Bu patojen türlerde prepatent süre 5-15 gün, patent süre ise 16-21 gün arasında değişmektedir (1, 3, 10).

## 2.4 SIĞIRLARDA *EIMERIA* TÜRLERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ

Coccidiosis tüm dünyada sığırlarda yaygın olup, özellikle buzağı coccidiosis'i büyük problem oluşturmaktadır. Dünyada kapalı yetiştirme sistemlerinin yapıldığı sığır işletmelerinde hastalığın daha yaygın olduğu bildirilmektedir. Amerika kıtasından Japonya'ya, Hindistan'dan Ortadoğu ve Avrupa'ya kadar, bütün dünya ülkeleri

çiftliklerinde hastalık varlığını sürdürmektedir (1, 8, 10). Sığırlarda coccidiosis epidemiyolojisinde birçok risk faktörünün etkili olduğu belirtilmiştir. Hastalığın prevalansı yağmurlu mevsimlerde ya da yağmurlu günleri takiben daha yüksek görülmektedir. Coccidiosis olgularının görülme sıklığında yemleme sistemi, sulama şekli, ahır tipi, ahırın betonarme olması, yer tipi ve sürü büyüklüğünün etkili olduğu bildirilmiştir (10, 11). Klinik coccidiosis olgularının ortaya çıkmasında buzağların önemli rolü bulunmaktadır. Özellikle iki aylığa kadar olan buzağlar dışkıları ile daha fazla sayıda ookist çıkararak çevreyi kontamine etmektedirler. Buzağlar hastalığın başlangıcından itibaren dışkıları ile oldukça fazla ookist çıkarmaktadırlar (10, 12).

Hastalık buzağı sayısının fazla olduğu süt işletmelerinde problem oluşturmaktadır. Ayrıca süt sığırları danalarının coccidiosis'e daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Buzağlarda süt kesim sonrası enfeksiyon daha çok görülmüştür. Ayrıca süt kesiminden bir ay sonra buzağlar dışkıları ile daha fazla ookist çıkarmaktadırlar. Enfeksiyonun yaygınlığı süt kesim sonrası buzağların toplu halde meraya bırakılmalarını takiben artmaktadır (10, 13).

Sığırlarda coccidiosis kapalı yetiştirme tiplerinde önemli olmaktadır. Çünkü kapalı ortamlarda *Eimeria* ookistlerinin çok hızlı çoğalma potansiyeli bulunmaktadır. Bu tip ahır ve işletmelerdeki enfekte birkaç hayvan bile milyonlarca ookist çıkarmak süratiyle çevreyi kontamine etmektedirler. Çiftlik ya da ahır ortamında ookistler bir yıldan daha fazla enfektif özelliğini korumaktadırlar. Ayrıca ookistler 40°C sıcaklıktaki ahır altlıklarında ve çevrede canlılığını bir yıldan fazla koruyabilmektedirler. Ookistlerin hayvan yemleri ile saman ve otlar içerisinde sekiz ay kadar enfektif şekilde kaldığı bildirilmiştir (10, 14).

Coccidiosis'in yayılışında hayvanların bir arada kalabalık olarak bulundurulmaları, altlıkların temiz olmaması, yemlik ve sulukların dışkılarla bulaşması etkili olmaktadır. Hayvan sayısının fazla olduğu sürülerde bulaşma riskide yüksek bulunmuştur. Sürü büyüklüğü ile bağırsak protozoonlarının (*Eimeria*, *Cryptosporidium*) arasında pozitif bir ilişki tespit edilmiştir. Coccidiosis endüstriyel işletmelerde yani; hayvan sayısının fazla olduğu kapalı ve yarı kapalı işletmelerde ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Sığırlarda coccidiosis oluşumunda etkili çevresel ve yetiştiricilikle ilgili faktörler olduğu için mevsim geçiş dönemleri, doğum sezonları ve hayvan nakilleri önemli olmaktadır. Coccidiosis görülmeyen bir işletmeye, enfekte ahırlardan ya da bölgelerden hayvan

ticareti ile gelen değişimlerde, 2-3 hafta sonra bu işletmelerde hastalık ortaya çıkabilmektedir (7, 10, 15, 16).

Enfeksiyon; sporlanmış ookistlerin su ve gıdalarla ağız yoluyla alınması ile bulaşmaktadır. Hastalık etkeni *Eimeria* ookistlerinin sporlanması için gerekli olan rutubet, oksijen ve sıcaklık hastalık riskini artırmaktadır. Kontaminasyonun fazla olduğu yerlerde, danalarda ve hatta yaşlı hayvanlarda hastalık görülebilmektedir. *Coccidia* ookistleri ile kontamine meralardan hazırlanan kuru otların buzağılara yedirilmesi sonucu bu hayvanlarda enfeksiyon görülmüştür. Hayvanların bir yerden başka bir yere naklinden sonra bulaşmada bir artış olduğu da belirtilmiştir. Bunlara ilaveten 1-5 aylık buzağların meraya bırakılmadan önce ahır besisinde tutulmaları ya da bir yaşına kadarki dönemde kapalı alanda bir arada tutulan hayvanların toplu halde meraya bırakılmalarının da etkili faktörler olduğu bildirilmiştir (8, 10, 17).

*Eimeria* enfeksiyonlarının karakteristik özelliği; çok sayıda sığırın enfekte olmasına rağmen, sadece birkaç işletmede ya da sınırlı sayıda hayvanın hastalanmasına neden olmasıdır. Yaşlı hayvanlar daha önce geçirdikleri enfeksiyonlar sonucu bağışıklık kazanmaktadır. Dolayısı ile bunlarda subklinik enfeksiyonlar görülmektedir. Sığır coccidiosisinde morbidite %100'lere kadar varmasına rağmen, klinik vakalar genellikle buzağılarda ortaya çıkmakta ve ölümler görülmektedir. Klinik vakalar buzağların tekli bölmelerden toplu halde bulundukları işletme önlerindeki padoklara alınmasını takiben ya da meraya toplu halde bırakılması süresince ortaya çıkmaktadır. Coccidiosisin ortaya çıkmasında ve devamlılığının sağlanmasında etkili predispoze faktörler; düzensiz beslenme, ahır ısısının 18-21<sup>0</sup>C den yüksek olması, havadaki nem oranının %75'i geçmesi, bakteriyel ve viral hastalıklar sayılmaktadır. Ayrıca mide-bağırsak nematod enfeksiyonları (*Trichostrongylus* sp., *Ostertagia* sp., *Cooperia* sp. gibi) coccidiosis'in daha ciddi seyretmesine neden olmaktadır. Sığırlarda çoğunlukla *E. zuernii*'nin neden olduğu "kış coccidiosis'inin" ortaya çıkmasında stres, sütten kesilme, yem değişikliği, yetersiz beslenme, soğuk ve yer değişikliği gibi predispoze faktörler rol oynamaktadır. Bunlara ilaveten hayvanların altlarına serilen altlıklar, deri rutubeti, vücut ısısı da ookistlerin sporlanması için uygun ortamı oluşturmakta ve latent enfeksiyonlar akut hale geçmektedir (1, 10, 18). Coccidiosis genellikle iki veya daha fazla türün oluşturduğu miks enfeksiyonlar şeklinde görülmektedir. Klinik coccidiosis olgularında da çoğunlukla miks enfeksiyonlar görülmüştür (9, 10, 19, 20).

#### 2.4.1 Coccidiosis'in Türkiye'deki Yayılışı

Türkiye'de sığırlarda coccidiosis etkenleri oldukça yaygın görülmektedir. Buzağılarda *Eimeria* türlerinin prevalansı %60-90 arasında değişmektedir. Dana ve yaşlı sığırlarda da coccidia ookistleri %90'lara varan yaygınlık göstermektedir (10). Ancak klinik coccidiosis vakalarına bir yaşına kadar olan buzağı ve danalarda rastlanmakta, bu hayvanlarda dışkı ile atılan ookist sayısı da daha fazla olmaktadır. Enfekte buzağılar dışkıları ile en yoğun ookisti 3-5 haftalık yaşlarda çıkarmaktadırlar (10, 21). Ülkemizin farklı bölgelerindeki 17 ilde bulunan buzağılarda 2010 yılında *Eimeria* ookistlerinin prevalansı %28,9 düzeyinde bulunmuştur (10). Bu durum hastalık yaygınlığının azaldığını göstermektedir. Ancak %30'lar düzeyindeki ookist görülme sıklığı olan işletmelerde bile, her zaman klinik coccidiosis olgularının görülmesi kaçınılmazdır. Coccidiosis belirtileri görülmeyen etçi sığır işletmelerindeki buzağılarda %27, ineklerde ise %15,7 oranlarında *Eimeria* türleri saptanmıştır (22). Ülkemizde etçi veya sütçü sığır işletmesi olsun, yetiştirme tarzında büyük farklılıkların olmadığı bilinmektedir. Nitekim sütçü sığır işletmelerindeki buzağılarda %25,9 düzeyinde coccidia ookisti saptanmıştır. Bu tip işletmelerdeki ishallerli buzağılarda ve köy koşullarındaki ahırlarda bulunan hayvanlarda hastalık etkeni daha yaygın olarak bildirilmesine rağmen bu yaygınlığın %30'lar düzeyinde seyrettiği belirtilmiştir (23).

Erişkin sığırlarda coccidiosis olguları genellikle subklinik enfeksiyon şeklinde görülmektedir. Ancak buzağılar başta olmak üzere 3-8 haftalık buzağılarda klinik coccidiosis vakalarına rastlanmaktadır. Ülkemizde sığırlarda *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. auburnensis* ve *E. ellipsoidalis* tüm bölgelerde yaygın olarak görülen coccidiosis etkenleri olup, Türkiye'de sığırlarda; *Eimeria alabamensis* (%2-29), *E. auburnensis* (%17-55), *E. bovis* (%29-48), *E. brasiliensis* (%1-11), *E. bukidnonensis* (%1-12), *E. canadensis* (%6-28), *E. cylindrica* (%4-26), *E. ellipsoidalis* (%3-26), *E. illinoisensis* (%2-5), *E. subspherica* (%2-24), *E. zuernii* (%12-36) ve *E. wyomingensis* bildirilmiştir (9, 15, 19, 21-32). Türkiye'de yaşlı sığırlarda coccidiosis latent ya da subklinik enfeksiyonlar halinde görülmektedir. Yaşlı hayvanlarda coccidia ookistleri oldukça yaygındır. Altı ayıktan büyük dana ve yaşlı sığırlar dışkıları ile sürekli ookist çıkardıklarından buzağılar için portör olarak görev yapmaktadırlar. Hatta periparturient dönemdeki ineklerde %65 oranında *Eimeria* türleri saptanmıştır. Bu durum doğumu takiben yeni doğan buzağılarda klinik coccidiosis olgularının görülmesine neden olabilmektedir (10, 15).

#### 2.4.2 Coccidiosis'in Dünyadaki Yayılışı

Dünya'da sığırlarda coccidia ookistleri yaygın olarak görülmekte olup, tüm yaş grubundaki sığırlarda görülmektedir. Klinik coccidiosis vakalarına ise buzağılarda rastlanmaktadır. Neonatal buzağı ishallerinde önemli etiyolojik ajan olan *Eimeria* türleri, iki haftalıktan itibaren sorun olmaya başlamaktadır. Özellikle üç haftalıktan altı aylığa kadar olan buzağılarda önem arz etmektedir. Daha yaşlılarda ciddi sorun oluşturmadığı kaydedilmiştir. Ancak yaşlı hayvanlar enfekte olduklarında az sayıda ookistleri dışkıları ile atarak gençler için portörlük görevi yaptıkları belirtilmiştir. Dünya'nın birçok ülkesinde, genel olarak tüm dünya'da coccidiosis yaygın olarak rastlanmaktadır. Klinik coccidiosis olguları da buzağılarda sıklıkla görülmektedir. *Eimeria* ookistlerinin prevalansı hayvanların yaşı başta olmak üzere coccidiosis risk faktörlerine göre değişmekle beraber %80'lere kadar çıkmaktadır. Dünyada sığırlarda *Eimeria bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis* ve *E. auburnensis* yaygın olarak saptanan coccidiosis etkenleridir (1, 14, 18, 20). Son yıllarda yapılan çalışmalarda sığırlarda *Eimeria* türlerinin yaygınlığı Pakistan'da %47 (11), Estonya'da %37 (14), Polonya'da %52,8 (33) oranlarında bildirilmiştir.

#### 2.5 SIĞIR COCCIDIOSIS'İNDE KLİNİK VE PATOGENEZ

Coccidiosisde klinik belirtiler, hastalığa neden olan *Eimeria* türüne göre değişmektedir. Çünkü enfeksiyonun şiddeti üzerinde, *Eimeria* türü, alınan sporlanmış ookist sayısı ve konağın bağışıklık durumu etkili olmaktadır. Klinik olgulara *E. bovis* ve *E. zuernii* türleri neden olmaktadır. Prepatent süre 7-21 gün arasında değişmektedir. Klinik belirtiler akut coccidiosisin görüldüğü buzağı ve danalarda dikkati çekmektedir. Daha yaşlı sığırlarda subklinik enfeksiyonlar şekillenmektedir. Hastalık perakut, akut ve subklinik coccidiosis olmak üzere üç farklı klinik formda görülmektedir (1, 8, 10).

Akut coccidiosis 1-3 aylık buzağılarda sıklıkla görülmektedir. Ancak bir yaş civarı danalarda da sporadik olgular halinde rastlanmaktadır. Akut coccidiosisin başlangıç devresinde ilk bulguların , ani olarak ortaya çıkan pis kokulu, koyu yeşil renkli ve seröz tabiatlı ishal olduğu görülmüştür. Hayvanın arka kısmı gaita ile bulaşık olup, dışkıda kan izleri ve pıhtılaşmış kan görülmektedir. Kanlı ishal devam etmekle beraber hayvanın genel durumunun iyi olduğu dikkati çekmektedir. Bazı olgularda kan izleri taşıyan normal kıvamlı dışkıda görülebilmektedir. Hastalığın bu başlangıç devresi 1-2 gün devam

etmektedir. Akut coccidiosisın ikinci aşaması olan orta devrede ise diyare sümüksü, yapışkan kıvam halini almaktadır. Dışkı fena kokulu ve su gibi olup, ayrıca içerisinde müköz sıvı, fibröz zar ve kan bulunmaktadır. Tipik dizanteri tablosu şekillenmiş olup, kan akışı ve tenesmus görülmektedir.

Bağırsak hareketlerinin çok artması nedeni ile bağırsak invaginasyonu ve prolapsus rekti oluşabilmektedir. Hayvanın yem tüketimi azalmakta, süratle zayıflamaya başlamakta ve yattığı yerden kalkamaz duruma gelmektedir. Vücut ısısı 40-41°C'ye çıkabilmekte, iştahsızlık, su içme ihtiyacının artması, derinin kuruması, kılların dikleşmesi görülen diğer belirtiler olarak bildirilmektedir. Bu dönem ise 5-6 gün devam ederken, akut coccidiosisın son aşamasında dışkı mukuslu, difteroid membranlarla karışık, kahverengi, siyah ve genellikle kırmızımsı renkte görülmektedir. Bağırsakta aşırı derecede kanama olduğu için, kan dışkıya karışmış olup, rektal muayenede rektum mukozasının kalınlaşmış, ödematoz, ağrılı ve hiperemik olduğu görülmektedir. Anüs hiç kapanmadığı, hayvanın dört ayağını uzatmış bir şekilde yatar durumda olduğu, yem tüketemediği ve vücut ısısının 35-36 °C'ye düştüğü ve bu bulgulara titreme, gerginlik ve çarpınma gibi sinirsel belirtilerin eklendiği izlenmektedir. Bu aşamada tedavi edilmeyen olgular ölümle sonuçlanabilmektedir (1, 8, 10).

Subklinik coccidiosis tipi, sığırlarda daha yaygın olup, genellikle yaşlı hayvanlarda görülmektedir. Oluşan immunité nedeniyle klinik olarak dikkati çekmeyen latent enfeksiyonlardır. Klinik olarak bazen hafif kanamalı olan ishaller enterit tablosu şekillenebilmektedir. Dışkı kokulu ve epitel artıkları görülebilir. Hayvanın genel durumu çok kötü değildir ve 2-3 hafta içinde iyileşmektedir (10).

Perakut coccidiosis olguları çoğunlukla buzağı ve danalarda saptanmaktadır. Hastalığın bu formu sporadik vakalar halinde görülmektedir. Genellikle kış aylarında ve stres faktörlerinin de devreye girdiği dönemlerde ortaya çıkmaktadır. Sinirsel belirtiler ve meningoensefalit tablosu oluştuğundan, coccidiosisın bu tipine “sinirsel coccidiosis (nervous coccidiosis)” ya da coccidiosisın “nörolojik sendromu” adı verilmiştir. Patogenezi tam olarak bilinmemekle beraber sinirsel coccidiosisli buzağların serumlarında labile nörotoksin (LNT) saptanmıştır. Bu toksin sadece coccidial enteritli olan ve sinirsel semptom gösteren hayvanların serumlarında tespit edilmiştir. Ayrıca labile nörotoksin, coccidiosisli hayvanların bağırsak mukozası ve ookistlerden de izole

edilmiştir. Klinik olarak diyare, tenesmus, kas titremeleri, konvülziyon, opistotonos, nistagmus, körlük, çırpınma krizleri ve ataksi gibi sinirsel belirtiler görülmektedir. Coccidiosis bu nörolojik sendromuna enterik coccidiosis saptanan buzağların %30-50'sinde rastlanmaktadır. Sindirim sistemi ile ilgili semptomlar görülmeye başlamadan, 24-48 saat içinde sinirsel semptomların eşliğinde hayvanlarda ölüm olgularına rastlanmakta ve mortalite %50'lere varmaktadır. Buzağlarda sinirsel belirtilerin görüldüğü olgular akut klinikal coccidiosis olarak isimlendirilmektedir. Bu tip coccidiosis vakalarında ölüm oranı %80-90'lara kadar çıkmaktadır. Ayrıca per akut coccidiosis olguları 9-12 aylık olan danalarda da bildirilmiştir. Bu yaş grubu sığırlarda sinirsel belirtiler ile seyreden *E. zuernii* coccidiosis saptanmış olup, bir gram dışkıda ookist sayısının 50 binin üzerinde olduğu belirtilmiştir (1, 10).

Buzağlarda klinik coccidiosis belirtilerinde dışkı kıvamı ve dışkının kanlı olup olmaması önemli olup, genellikle klinik olarak kanlı ishalli semptom gösteren buzağlarda bu hastalık bildirilmiştir. Türkiye'de 25 gün ile 6 aylık arasındaki buzağlarda klinik coccidiosis olguları görülmektedir. Bu olgularda *E. bovis* ve *E. zuernii* türleri saptanmış ve hastalarda bir gram dışkıdaki ookist sayılarının ise 8 400-237 500 arasında değiştiği belirtilmiştir (19, 21). Buzağlarda klinik coccidiosis olgularına süten kesim sonrası dönemlerde, kış mevsimi bitişinde ve ilkbahar aylarında daha yaygın olarak rastlandığı ve bir gram dışkıda ookist sayılarının 10 000-54 000 arasında değiştiği vurgulanmıştır (10, 13). Ayrıca klinik olguların bir yaş civarı olan danalarda da görüldüğü ve genellikle *E. zuernii* coccidiosisinin olduğu bildirilmiştir (20). Bunlara ilaveten meraya bırakılmayı takiben buzağlarda *E. alabamensis*'in neden olduğu ishal olguları yayınlanmıştır. Bu tip olgularda otlama sezonunda hayvanlarda kilo kaybının olduğu belirtilmiştir (10, 34).

Sığırlarda coccidiosis, sindirim sistemini etkileyen ve bu sistemde bağırsaklara yerleşen bir hastalıktır. Enfeksiyonda etkenler öncelikle ince barsak epitel hücrelerine yerleşerek gelişmeye başlamakta ve daha sonra ise sekum ve kolon kısmına geçerek gelişmelerine buralarda devam etmektedirler. Bu nedenle hastalık barsaklardaki patolojik olaylarla ilişkili olarak gelişmektedir. Bağırsak epitel hücrelerinin yıkımı, villus kaybı, emilimin bozulması, enterit ve diyare temel patolojik olayların başında gelmektedir (8, 10).

Patogenez; alınan sporlanmış ookist sayısı, merogonik nesil adedi, merogoni sonucu oluşan merozoit sayısı ve parazitin doku ve hücrede yerleşim yerine göre değişmektedir.

*Eimeria bovis* ve *E. zuernii* en patojen türler olup, oldukça şiddetli (+++), *E. ellipsoidalis* orta derecede şiddetli (++), *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bukidnonensis* ve *E. cylindrica* ise daha az şiddetli (+) enfeksiyonlara neden olmaktadır (10).

Bağırsaklarda doku hasarları oluşması ve özellikle de kalın bağırsakta değişikliklerin başlaması ile birlikte epitel tabakası kaybından dolayı  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonlarının geri emilimi engellenmektedir. Kan serumunda  $\text{K}^+$  yükselmekte ancak  $\text{Na}^+$  azalmaktadır. Bunlara ilaveten kan plazmasında albumin ve total protein miktarında bir eksilme olmaktadır. Tüm bu olayların sonucunda da dehidrasyon tablosu ortaya çıkmaktadır. Dışkı ile su kaybı ve  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  iyonlarının plazma konsantrasyonunda azalması ile ortaya çıkan dehidrasyon tablosu, hastalığın başlangıç döneminde buzağılarda ölüm nedeni olabilmektedir. Ayrıca plazma proteinlerinin, mineral maddelerin ve daha sonrada eritrositlerin kaybı ile oluşan anemi sonucu eksitasyon tablosu ve ölüm şekillenmektedir. Nekropside bağırsak içeriği kanlı ve sulu dışkı ile dolu olup, bağırsak mukozasının kalınlaşmış, kırmızı ve havlu saçakları gibi tüylü bir hal aldığı görülmektedir. Yalancı membranlar altında sarımtırak-kırmızımsı ve hemorajik ülserler oluşmuştur. Bağırsakların akut, kataral, ülseröz ve difteroid yangısı şekillenmiştir. Ayrıca mesenterik lenf bezleri büyümüş, anüs mukozası ödemli ve hiperemik görünümündedir. Mukozalar soluk renkte olup, kaşeksi tablosu dikkati çekmektedir (1, 10).

*Eimeria bovis* ve *E. zuernii* enfeksiyonlarında kalın bağırsakların (sekum, kolon) derin dokularında, diğer türlerde ise; ince bağırsak epitelyumunda lezyonlar oluşmaktadır. *Eimeria bovis*'in 1. nesil merontları (makromerontlar=makroşizontlar) ince bağırsakların distal kısmındaki villusların lenf kanalları epitel hücrelerinde ve mezenterik lenf yumrularında meydana gelmektedir. Makromerontlar 300 (303x281)  $\mu\text{m}$  büyüklüğünde olup, bağırsak mukozası üzerinde mat beyaz renkte, darı tanesi şeklinde ve çıplak gözle görülebilmektedir. İkinci nesil merontlara ve gamontlara genellikle cekum olmak üzere, ince bağırsakların distal kısmında ve proksimal kolonda rastlanmaktadır. Enfeksiyonun 16-18. günlerinde ise bağırsak bezlerinin tüm epitel hücreleri 2. nesil meront ve gamontlarla dolu bir hal almıştır. Bunun sonucu bağırsak bezlerinin genişlediği ve subepitelyal hücrel infiltrasyonun olduğu belirtilmiştir. *Eimeria bovis* ve *E. zuernii*'nin sporlanmış ookistlerinin alınmasının 18. gününden itibaren epitel tahribatı, mukozalarda ödem, epitel üzerinde fibrin birikimi, kapillar damarlarda parçalanma gözlenmektedir. Kanamayla birlikte eritrosit kaybı artmaktadır. Ayrıca bağırsak bezleri

rejenere olmaya başlamakta, Lamina propria ile submukoza lenf ve kan damarlarının genişlemesiyle ödematoz bir hal almaktadır. Lamina propria üzerinde kan, fibrin, granülositler, bakteriler ve hücre kalıntılarından oluşan difteroid bir membran oluşmaktadır. *Eimeria ellipsoidalis* gibi daha az patojen türlerin neden olduğu olgularda bağırsaklarda epitel kaybı, mukus artışı ve kataral bir yangı görülmektedir (8, 10).

Sığırlarda intestinal coccidiosisden başka *hepatik coccidiosis* de görülmektedir. Buzağılarda safra kanalı epitel hücrelerinde ve safra kanalı lumeninde coccidiaların merontlarına rastlanmıştır. Bu tip olgular nadir olarak görülmekte ve hastalık hepatik coccidiosis olarak değerlendirilmektedir (10, 35).

## 2.6 SIĞIR COCCIDIOSIS'İNDE TANI

### 2.6.1 Konvansiyonel Morfolojik Tanı

Coccidiosis teşhisinde hayvanın klinik durumu ve yaşı dikkate alınması gerekmektedir. Buzağılarda kanlı olmayan ishal olguları, klinik olarak non-spesifik kabul edilmektedir. Ayrıca kanlı, mukuslu ya da fibrinli diyare olguları ise diğer birçok hastalıkları akla getirebilmektedir. Bunun için hayvanın yaşı, bulunduğu ortam, hijyen durumları ve klinik bulgular değerlendirilmelidir. Buzağı ve danalarda klinik belirtiler ve dışkı kıvamı tanıda önemli olup, dışkı kıvamına göre; normal (0), yumuşak (1), diyareli (2), diyareli ve doku artıklı (3), diyareli, kanlı ve doku artıklı (4) olarak sınıflandırılmaktadır. Hastalığın tanısında çeşitli yoğun solüsyonlar (NaCl, ZnSO<sub>4</sub> ZnCl<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub> ve Şeker solüsyonu) kullanarak flotasyon yöntemi ile dışkı incelemesi yapılmaktadır. Dışkı muayenesinde içinde sporontları bulunan sporlanmamış ookistler görülerek tanı koyulmaktadır. Enfeksiyon şiddetini belirlemek için McMaster tekniği ile de bir gram dışkıdaki ookist sayıları belirlenmektedir. Hastalığa neden olan *Eimeria* türlerinin ayırıcı tanımı için ise dışkı örnekleri %2,5'luk potasyum dikromat solüsyonu (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) içinde 27°C'de tutularak ookistlerin sporlanmaları sağlandıktan sonra flotasyon yöntemleri kullanılarak *Eimeria* tür tanımı yapılabilir (8-10).

Sığırlarda coccidiosisin tanısında dışkı muayenesinde sporlanmamış ookistlerin morfolojik yapılarına göre deneyimli kişilerce teşhis konulabilmektedir. Ancak bazı türlerin tanısında, miks enfeksiyonlarda yâda tipik ookistlerin olmaması durumunda kesin etiyolojik tanı için sporlandırma işlemi yapılması gerekmektedir. Sporlanmış ookistlerin

morfolojik özellikleri dikkate alınarak tür identifikasyonları yapılmaktadır. Ookistin şekli, rengi ve büyüklüğü tanıda önemli sayılmaktadır (Şekil 2.1) (1, 9, 10).

Coccidiosis tanısında bazı kriterlerin gözden kaçırılmaması gerekmektedir. Örneğin; dışkıda ookist görülmesi coccidiosis anlamına gelmemektedir. Patojen türlere ait ookistlerin yoğun olması ve klinik olarak da kanlı ishalin görülmesi coccidiosis olma ihtimalini arttırmaktadır. Dışkıda ookistlere rastlanmaması da coccidiosis olmadığı anlamına gelmemektedir. Çünkü *E. zuernii* ve *E. bovis* enfeksiyonlarında ookistler atılmadan önce patolojik lezyonlar oluşmaktadır. Teşhisi desteklemek için nekropsi sonucu bağırsaklardaki makroskobik lezyonlar incelenmelidir. *Eimeria* türlerinin gelişme dönemleri olan meront ve gamontlar yönünden de histopatolojik preparatlar hazırlanıp mikroskobik olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Sığırlarda coccidiosis kesin teşhisi için nekropsi yapılması ekonomik olmadığından önerilmemektedir. Ancak hastalığa bağlı ölüm olayları varsa, bu durumda nekropsi yapılabilmesi önerilmektedir (8, 10).

Klinik olarak kanlı ishal görülmesi, bir gram dışkıdaki ookist sayısı (OPG) 5.000-10.000 üzerinde olması ve patojen türlere ait ookistlerin belirlenmesi klinik coccidiosis olgularına işaret sayılabilmektedir. Ancak klinik belirtiler ve bir gram dışkıda yüksek sayıda (50.000-500.000) ookist olması klinik coccidiosis olarak değerlendirilmektedir. *Coccidia* ookistleri iki haftalıktan itibaren buzağuların dışkılarında görülmeye başlamaktadır. Genellikle bir aylık olduklarında ookist yoğunluğu artmaktadır. Klinik olarak yumuşak dışkıly veya kanlı ishelli olan hayvanlarda ookist sayısının normal dışkıly olanlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (19, 21).

### 2.6.2 Serolojik Tanı

Sığırlarda coccidiosis tanısında dışkı muayenesinde ookistlerin morfolojik yapılarının görülmesi ile konulan teşhis, dünyada halen geçerli altın standart tanı metodu olarak değerlendirilmektedir. Ancak son yıllarda serolojik ve moleküler metodlar da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan enzim linked immunoassay (ELISA), western blot ve PCR tanı ve araştırma amaçlı olarak kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Serolojik tanıda *Eimeria* türleri arasındaki ya da diğer patojenler ile oluşabilecek çapraz reaksiyonların göz önünde bulundurulması gerekmektedir (10, 14, 16).

### 2.6.3 Ayırıcı Tanı

Sığırlarda coccidiosisin ayırıcı tanısı yapılırken özellikle diyare ile seyreden *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., Clostridial enteritis, *Campylobacter* spp., Rota virus, Corona virus, Bovine Viral Diyare, giardiosis, cryptosporidiosis ve intestinal helminthosis gibi enfeksiyonların da dikkate alınması gerekmektedir (10).

## 2.7 SIĞIR COCCIDIOSIS'İNDE TEDAVİ

Klinik bulgular hastalığın son dönemlerinde ortaya çıktığı için tedavide bu durumun dikkate alınması gerekmektedir. *E. bovis* ve *E. zuernii* coccidiosisinde enfeksiyonun 17-18. günlerinde ilk klinik bulgular görülmektedir. Bu nedenle ne kadar erken dönemde tedaviye başlanılırsa sonuçta o kadar başarılı sonuçlar alınabilmektedir. Ayrıca bir sürüde birkaç hayvan hasta ise bu hayvanlar ile birlikte diğerlerinin de tedaviye alınması gerekmektedir. Coccidiosis tedavisinde sulfonamidler başta olmak üzere çok sayıda anticoccidial ilaç önerilmektedir. Sığırlarda coccidiosis tedavisinde kullanılan ilaçlar Tablo 2.2'de verilmiştir (1, 10).

**Tablo 2.2** Sığırlarda coccidiosis tedavisinde kullanılan anticoccidial ilaçlar

|                     |                                               |
|---------------------|-----------------------------------------------|
| Sulfaquinoxaline    | 15 mg/kg, 4 gün, peros                        |
| Sulfamethazine      | 50-100 mg/kg, 4 gün, peros                    |
| Sulfaguanidine      | 100 mg/kg, 3 gün, peros                       |
| Sulfathiazole       | 150 mg/kg, 3-6 gün, peros                     |
| Sulfadimidin Sodyum | 50-100 mg/kg, peros                           |
| Sulfadimethoxine    | 55 mg/kg (ilk gün), 27,5 mg/kg, 4 gün, peros, |
| Toltrazuril         | 10 mg/kg, günde 2 kez, 2 gün, peros           |
| Furazolidon         | 15-30 mg/kg, 3-7 gün, peros                   |
| Amprolium           | 10 mg/kg, 5 gün, peros                        |

Klinik coccidiosis olgularında sulfonamidler; trimethoprim (sulfadiazin+trimethoprim, sulfadimethoxin+trimethoprim, sulfamonomethoxine+ormetoprim) ile birlikte kombine olarak kullanılabilir. Ayrıca ileri vakalarda ve çok acil durumlarda sulfadimidin (%33 lük) damar içi (iv) uygulanmaktadır. Sığırlarda klinik coccidiosisin tedavisinde toltrazuril (1x20mg/kg) oldukça etkili olup, kullanılan ilaçların başında gelmektedir. Sütçü ve etçi buzağılarda *E. zuernii* ve *E. bovis* ile doğal enfekte buzağılarda coccidiosis tedavisinde 15 mg/kg dozda ağız yolu ile kullanılan tottrazuril'in yüksek düzeyde etkili olduğu ve

hayvanda büyüme performansına olumlu etki ederek ekonomik kayıpları azalttığı bildirilmiştir (10, 36).

Anticoccidial ilaçlar genellikle yem, süt ve su ile verilmektedir. Ayrıca monensinin intraruminal bol'leri profilaktik amaçla kullanılmaktadır. Özellikle buzağılarda mera çıkışı öncesinde 1 bol /200 kg CA dozda (1,6 gr baquiloprim ve 14,4 gr sulphadimidine) kullanılmasıyla klinik coccidiosis'e bağlı ishal vakaları önlediği gibi, kilo artışı da olumlu yönde etkilemektedir. Anticoccidial ilaçlar genellikle merontlara etkili olduğu için tedavide bu durumun dikkate alınması gerektiği bildirilmiştir (10, 13). Ayrıca buzağılarda süten kesim sonrası üç ay süre ile lasalocid (1 mg/kg CA) ve decoquinate (0,5 mg/kg CA) verilmesiyle klinik coccidiosis olgularının önlediği belirtilmiştir (10, 37).

Klinik vakaların görülmesi ile tedavide geç kalınmış olabileceği her zaman akılda tutulmalıdır. Buzağılarda ishal başlaması ile hastanın hekime ulaştırılması arasında süre uzadıkça olgu daha da ciddi duruma gelmektedir. Bu nedenle buzağı coccidiosis tedavisinde kliniğe intikal eden hastaların tedavisinin yanında sürü ya da çiftlikteki tüm hayvanlarda ilaç kullanılması önerilmektedir. Coccidiosis sağaltımında temel hedeflerden biriside semptomatik tedavidir. Yani hem klinik belirtilerin ortadan kaldırılmasına yönelik tedavi yapılmalı hem de etiyolojik tedavi uygulanmalıdır. Ayrıca klinik coccidiosis olgularında özellikle dehidrasyona karşı destek tedavinin de yapılmasının önemli olduğu bildirilmektedir (10).

## **2.8 SIĞIR COCCIDIOSIS'İNDE KORUNMA VE KONTROL**

Coccidiosisin korunmasında yönetim, bakım-besleme ve hijyen dikkat edilmesi gereken en önemli hususlardır. Bunlardan çiftlik yönetimi ya da sürü yönetimi bir işletmede coccidiosis hastalığından korunmada ve bu hastalığı kontrol altına almada en önemli faktörlerin başında gelmektedir. Ahır veya çiftlikteki hayvan grupları sayısı, grup yoğunluğu, ahırdaki sıcaklık ve hava değişimi, inşaat tipi ve çiftlik altlık biçimi, hijyenik durum ve temizleme biçimleri, besleme şekli ve yem içerikleri, hayvanların rotasyonu ve klinik coccidiosisli hayvanların ayrı bölmelere alınması gibi temel korunma faktörlerinin dikkate alınması gerekmektedir (7, 10).

Genç ve yaşlı hayvanların ayrı bölmelerde bulunması, özellikle buzağların doğumu takiben 24 saat içinde analarından ayrılması ve ayrı bölmelerde tutulmaları gerekmektedir. Ahırda kapasitesinden fazla sayıda hayvan bir arada barındırılmaması, kapalı ve yarı kapalı işletmelerde, padoklarda bulunan hayvan sayısına dikkat edilmesi önerilmektedir. Özellikle sütçü işletmelerde buzağı sayısı fazla olduğu için ahırların ön kısımlarındaki padoklarda hayvanların kalabalık olarak bulundurulmaması gerekmektedir (10, 19). Ahırlar düzgün betondan yapılmış olmalı, çatlak ve yarıklar olmamalı, yem ve sulukların dışkı ile bulaşması önlenmeli, altlıklar günlük olarak sabah ve akşam yemleme öncesinde temizlenmeli, hayvanların ot ve saman gibi yemleri yerden yemesi engellenmelidir. Ahır ısısı 18°C'yi geçmemeli ve rutubetli ortamı önleyecek şekilde havalandırılmalıdır. Çiftliklerde ahır sıcaklığının 15°C'nin, ahır rutubetinin ise %80'nin altında kontrolde tutulması ile klinik coccidiosis vakalarının azalacağı bildirilmiştir (8, 11). Buzağların süttten kesim sonrası dönemde ve meraya bırakılacağı zaman dikkatli olunması gerekmektedir. Buzağlar bakteriyel, viral ve gastrointestinal nematod enfeksiyonları yönünden kontrol edilmeleri, kış coccidiosisinde rol oynayan predispoze faktörlerin oluşumu engellenmesi önerilmektedir (10, 13).

Sığırlarda coccidiosisin kontrol ve korunmasında yukarıda anlatılan genel tedbirlere ilaveten kemoprofilaksi ve immunoprofilaksi de önemli bir yer tutmaktadır. Kemoprofilakside anticoccidial ilaçlar profilaktik amaçla kullanılmaktadır. Buzağlara 6 aylığa kadar olan dönemde ve özellikle de meraya bırakılması aşamasında, tekli bokslardan toplu bokslara alınma zamanında ve süttten kesim sırasında profilaktik amaçlı anticoccidial ilaçların kullanılması önerilmektedir. Profilaktik amaçla; amprolium (5 mg/kg CA, 21 gün), decoquinate (0.5 mg/kg CA, 28 gün) , monensin (1 mg/kg CA, 30 gün), lasalocid (1 mg/kg CA, 6 haftalığa kadar) ve salinomycin (0.7-1.2 mg/kg CA) hayvanların yemlerine katılarak kullanılmaktadır. Aşılama pratikte sığır coccidiosisinde uygulanmamaktadır (10, 13, 37).

Tüm bu önlemlere rağmen coccidiosisin ortadan kaldırılması ve hayvanların korunmasında tam başarı elde edilememektedir. Ancak klinik vakaların önüne geçildiği gibi ekonomik kayıplarda önlenmiş olmaktadır. Sporlanmamış ookistler, güneş ışınları ve %25 den daha az nisbi nemli kuru ortamlarda 4 günde canlılıklarını kaybetmektedirler. Ookistlerin -8°C de 2 aylık bir sürede büyük bir çoğunluğu, -30°C de ise bir günde tamamı, enfektif özelliklerini kaybetmekte olup, yüksek sıcaklık (48°C civarı) ookistlerin

büzüşmesine neden olmakta ve bu tip ookistler sporogonik çoğalma dönemine geçemedikleri için enfektif olamamaktadırlar. Ahır dezenfeksiyonunda ookistler üzerinde öldürücü etkili olan %1'lik amonyak, %5'lik fenol, %25'lik formaldehit, %1.25'lik sodyum hipoklorit ve %0,5'lik kreosol kullanılmaktadır (8, 18)(Levine, 1985, Parker ve Jones, 1990).

## 2.9 SIĞIR *EIMERIA* TÜRLERİ ÜZERİNE MOLEKÜLER VE FİLOGENETİK ÇALIŞMALAR

Günümüze kadar ookist morfolojisine dayalı identifikasyon, sığırlarda coccidiosis'e yol açan türlerin ayrımında kullanılan yaygın tek yöntemdir (1). Sığır coccidial ookistlerinin detaylı morfolojisi Levine ve Ivens (1967, 1970) tarafından tarif edilmiş ve bu teşhis anahtarları tür teşhisine yönelik birçok çalışmada refere edilmiştir (12, 38, 39). Ancak morfoloji tabanlı tür teşhislerinin, birçok türün karışık özellikler göstermesi ve tür içi varyasyonların varlığı dolayısıyla güvenilirliğinin yeterli olmadığı da belirtilmiştir (40). Morfolojik tabanlı teşhis ayrıca deneyimli kişilere gereksinim göstermekte, yoğun emek ve zaman alıcı olmaktadır (41). Moleküler tabanlı teşhis yöntemleri son yıllarda bir çok paraziter enfeksiyonun spesifik teşhisinde ve genotiplemede yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak sığır coccidia etkenlerinin teşhisi ve moleküler karakterizasyonu üzerine çalışmaların oldukça sınırlı olduğu dikkati çekmektedir. Li ve ark (42), Çin'de sığırlarda *Cyclospora* ve patojenik *Eimeria* türlerinin (*E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. ellipsoidalis* ve *E. zuernii*) ayrımı amacıyla, elde ettikleri izolatların 18S rRNA gen sekanslarını filogenetik olarak analiz etmişler, *Cyclospora* ve ruminant *Eimeria* türlerinin bu gen bölgesine göre sekans ve RFLP analiz yöntemleri ile ayrılabilceğini kaydetmişlerdir. Aynı araştırmacılar (42) GenBank'a kaydettikleri sınırlı sayıdaki sığır patojenik *Eimeria* türlerine ait izolatların sekans analizi sonucunda ise 18S rRNA gen bölgesine göre türler arası varyasyonun düşük olduğunu ve bu gen bölgesi hedef alınarak PCR tabanlı yöntemlerin sığır *Eimeria* türlerinin ayrımında yeterli olmayacağını hipotez etmişlerdir. Bunun yanında Kaya (43), Bristol/İngiltere'de koyunlardan izole edilmiş patojenik 6 *Eimeria* türünün (*E. ovinoidalis*, *E. crandallis*, *E. ahsata*, *E. weybridgensis*, *E. faurei* ve *E. bakuensis*) moleküler filogenisi üzerine araştırmalarda bulunmuş, 18S rRNA gen bölgesine göre türler arasında yüksek homoloji görülmesinden dolayı tür bazlı teşhiste bu gen bölgesinin yeterli olmayacağını ileri sürmüştür. Ayrıca aynı araştırmacı (43) 18S rRNA sekans analizlerine göre koyunlardaki *Eimeria* türlerinin monofiletik grupta

yer aldığını, bu türlerin diğer bir grupta yer alan kanatlı *Eimeria* türlerinden filogenetik farklılığının yüksek olduğunu, *E. bovis* ile ise daha yakın olduğunu göstermiştir. Kokuzawa ve ark. (44), Japonya’da sığırlardan izole edilmiş farklı 10 *Eimeria* türüne ait izolatları 18S rRNA sekansları temelinde filogenetik olarak incelemişler, izolatların tür bazlı olarak 3 monofiletik grupta yer aldığını ve her grupta yer alan türlere ait izolatların da benzer ookist morfolojisi göstermediğini belirlemişlerdir.

Sığırlarda patojenik *Eimeria* türlerinin konvansiyonel PCR ile ayrımı üzerine günümüze kadar yalnızca Japonya’da sığırlardan izole edilmiş patojenik *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis* ve *E. zuernii* türleri üzerine yalnızca bir çalışmanın (40) varlığı görülmektedir. Bu çalışmada (40) söz konusu türlere ait toplam 21 izolatın ITS-1 gen bölgeleri filogenetik olarak analiz edilmiş, pairwise alignment sonuçlarına göre aynı türe ait izolatlar arasında %90’nın üzerinde yüksek homoloji görüldüğü, *E. bovis* ve *E. zuernii*’nin aynı küme (cluster) içinde birbirine çok yakın olduğu görülürken, bu clusterın *E. alabamensis* ile birlikte *E. auburnensis*, *E. cylindrica* ve *E. ellipsoidalis* bulunduran majör sığır coccidia clusterından genetik olarak daha uzak olduğu kaydedilmiştir. Aynı çalışmada (40) tür bazlı spesifik teşhis için primer setlerinin dizaynında, ITS-1 gen bölgesinin yeterli inter-spesifik sekans varyasyonu gösterdiği saptanmış ve PCR tabanlı bu gen bölgesini hedef alan teşhis yönteminin *Eimeria* türlerinin saptanması ve ayrımında konvansiyonel ookist morfolojisini belirlemeye yönelik identifikasyondan daha yüksek sensitiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur.

*Eimeria* türlerinde mt-COI gen bölgesi üzerine çalışmaların (45, 46) oldukça sınırlı olduğu, sığır *Eimeria* türleri üzerine ise filogenetik çalışmaların henüz bulunmadığı görülmektedir. Bununla beraber Ogedengbe ve ark.nın (45) kanatlı *Eimeria* türleri üzerine yürüttükleri çalışmada *E. zuernii*’ye ait bir izolatın (GenBank aksesyon: HM771687) mt-COI gen bölgesi karakterize edilmiş ve kanatlı türleriyle birlikte filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 SAHA ÇALIŞMALARI

##### 3.1.1 Araştırma Sahası ve Dışkı Örneklerinin Toplanması

Çalışmada, 2014 yılında Kayseri'nin Mahzemin yöresinde (Şekil 3.1) halk elinde süt ve besi sığırcılığı yapılan 23 ahırdaki farklı yaş, cinsiyet ve ırklara ait toplam 150 sığır örneklenmiştir (Tablo 3.1).



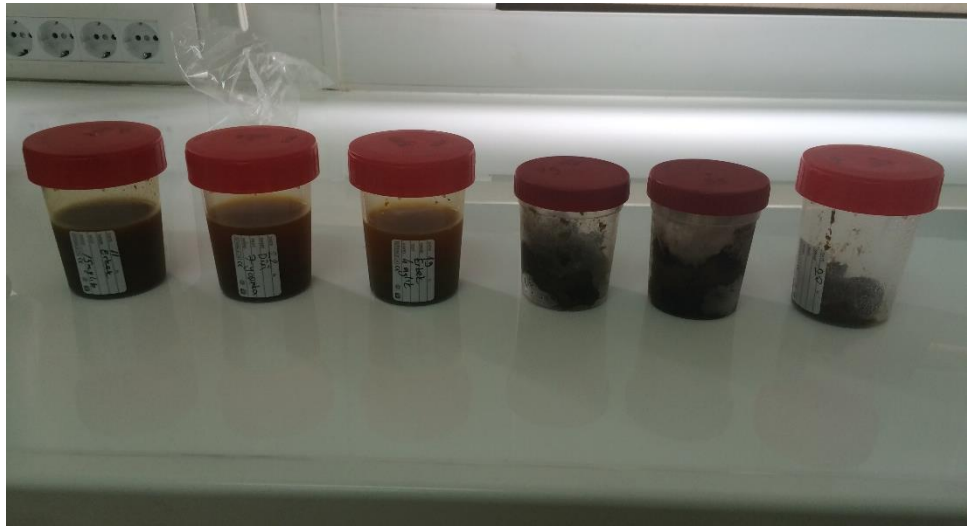
Şekil 3.1 Araştırma merkezi

**Tablo 3.1** Kayseri'nin Mahzemin yöresinde örneklenen sığırların yaş, cinsiyet ve ırklarına göre dağılımları

| Araştırma<br>Yöresi  | Sığır sayısı |         |        |          |      |          |          |          | Toplam |
|----------------------|--------------|---------|--------|----------|------|----------|----------|----------|--------|
|                      | Yaş          |         |        | Cinsiyet |      | İrk      |          |          |        |
|                      | ≤3 ay        | 4-12 ay | >12 ay | Erkek    | Dişi | Holstein | Simental | Montofon |        |
| Mahzemin,<br>Kayseri | 34           | 62      | 54     | 59       | 91   | 64       | 52       | 34       | 150    |

Hayvanların rektumundan tekniğine uygun şekilde alınan dışkı örnekleri, steril dışkı kaplarına aktarılarak, protokol kayıtları yapılmış ve soğuk zincirde laboratuvara

intikalleri sağlanmıştır. Örneklenen her bir hayvana ait dışkı numunesi 180 ml steril dışkı kabı içerisine %2,5 w/v potassium dichromate ile 2/1 oranında (100 ml potassium dichromate 50gr dışkı örneği) karıştırılarak konulmuştur (47). Ayrıca aynı hayvanlara ait örnekler sulandırılmadan direkt olarak ayrı steril bir dışkı kabı içerisine de alınmıştır (Şekil 3.2). Toplanan dışkı örneklerinin karakterleri incelenmiş ve kıvamlarına göre a) normal, b) ishalli c) kanlı ishalli (48) olarak kayıt altına alınmıştır.



Şekil 3.2 Araştırma yöresinde toplanan sığır dışkı örnekleri

### 3.2 LABORATUVAR ÇALIŞMALARI

#### 3.2.1 Konvansiyonel Dışkı Muayenesi

Laboratuvara getirilen örnekler *Eimeria* ookistleri yönünden analize tabii tutulmuştur. Bu basamakta standardizasyon açısından hem potassium dichromatlı hem de direkt dışkı örneklerinden alınan numuneler çöktürme ve/veya yüzdürme basamaklarına tabii tutularak ookistler yönünden incelenmiştir. Dışkı örneklerinden 3 gr tartılmış doymuş şekerli su (Sheather's sugar solution) (spesifik gravite: 1,27) (47) ile homojen hale getirilerek steril gazlı bezler yardımıyla 50ml falcon tüplerine süzölmüştür. Tüpler üzerine lamel kapatılarak 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş sonrasında oda ısısında 5 dk beklenerek lameller lam üzerine alınıp ışık mikroskopunda ookistler yönünden incelenmiştir. İnceleme esnasında tüpler üzerine tekrar lamel kapatılarak 5-10 dk beklenmiş ve akabinde ikinci lamel de incelemeye tabii tutulmuştur.

Potassium dichromatlı örneklerin incelenmesinde Gajadhar (49) tarafından bildirilen yöntemin TÜBİTAK 113 O 597 kodlu ve "İç Anadolu Yöresinde Sığır Coccidiosisine

Yol Açan Patojen *Eimeria* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Teşhiste Türe Özgü Real Time PCR Tekniğinin Geliştirilmesi” başlıklı araştırma projesi (50) kapsamında modifiye edilmiş versiyonu kullanılmıştır. Eşit hacimde dışkı numunesi olmak üzere potassium dichromatlı örneklerden 9 ml alınarak steril gazlı bezler yardımıyla 50 ml falcon tüplerine süzölmüş ve üzeri deiyonize su ile 50 ml’ye tamamlanmıştır. Tüpler 4000 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda tüpte 2 ml sediment bırakılarak süpernatant dikkatlice atılmıştır. Yıkama işlemi aynen bir kez daha tekrar edilmiş ve falcon tüp içerisindeki 2 ml sediment homojen hale getirilip 15 ml santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler yüzeyine kadar doymuş şekerli su ile doldurulmuş, bombe oluşturularak lamel kapatılmıştır. 1500 rpm’de 10 dk santrifüje tabii tutulan tüpler üzerinden, lamel altındaki damla düşürülmeden alınarak ışık mikroskobu altında incelemeye tabii tutulmuştur. İnceleme süresince tüpler üzerine tekrar lamel kapatılarak 5-10 dk beklenmiş ve akabinde ikinci lamel de incelemeye tabii tutulmuştur.

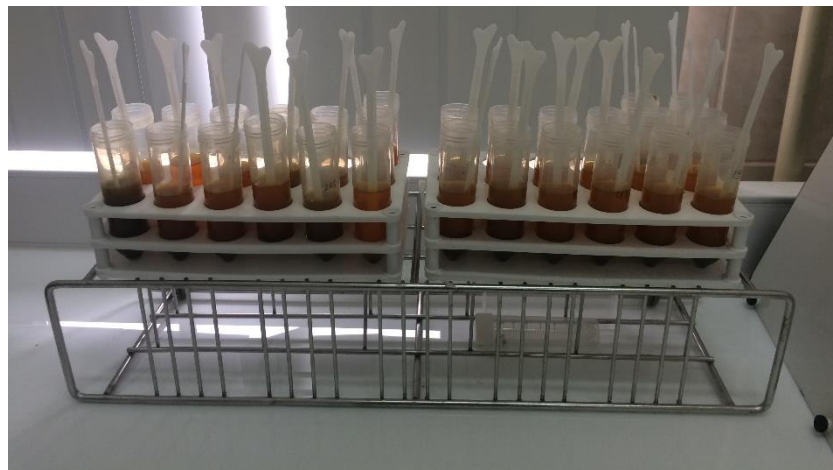
### 3.2.2 Gram Dışkıdaki Ookist Sayısının (OPG) Belirlenmesi

*Eimeria* ookistleri yönünden pozitif bulunan dışkı örneklerinde gram dışkıdaki ookist sayısının (OPG) belirlenmesinde Velkers ve ark. (51) tarafından tarif edilen tekniğin TÜBİTAK 113 O 597 kodlu ve “İç Anadolu Yöresinde Sığır Coccidiosisine Yol Açan Patojen *Eimeria* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Teşhiste Türe Özgü Real Time PCR Tekniğinin Geliştirilmesi” başlıklı araştırma projesi (50) kapsamında modifiye edilmiş versiyonu kullanılmıştır. 6 ml potasyum dicromatlı dışkı örneği 50 ml falcon tüp içerisine alınmış, üzerine 20 ml doymuş tuzlu su (151 g/l, specific gravity 1,1) ilave edilerek homojen hale getirilmiştir. Bu tüpten 2 ml alınarak kapaklı plastik santrifüj tüplerine konulup üzerine 8 ml doymuş tuzlu su (311 g/l, specific gravity 1,2) ilave edilerek karıştırılmıştır. Buradan pipet ile McMaster lamininin iki gözü doldurularak en az 5 dk beklenmiş ve ookist sayımı her iki gözde yapılmıştır. Gram dışkıdaki ookist sayısı (OPG):  $333.3ab/\text{örnek miktarı}$  formülüyle belirlenmiştir (a: Ookist sayısı; b: Sulandırma katsayısı; örnek miktarı 2gr; pozitif örneklerde sayım kamerasında ookist saptanmaması durumunda OPG değeri 50 alınmıştır).

### 3.2.3 *Eimeria* Ookistlerinin Sporlandırılması ve Tür Teşhisleri

Coccidiosis yönünden pozitif belirlenen sığırlarda *Eimeria* türlerinin teşhisi amacıyla potassium dichromatlı dışkı örnekleri Rind ve Brohi (52) tarafından tarif edilen yöntemin

TÜBİTAK 113 O 597 kodlu ve “İç Anadolu Yöresinde Sığır Coccidiosisine Yol Açan Patojen *Eimeria* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Teşhiste Türe Özgü Real Time PCR Tekniğinin Geliştirilmesi” başlıklı araştırma projesi (50) kapsamında modifiye edilmiş versiyonu kullanılarak sporlandırma prosedürüne tabii tutulmuştur. Buna göre potasyum dicromatlı dışkı örneğinden karıştırıldıktan sonra 10 ml alınarak steril gazlı bez yardımıyla 50 ml falcon tüpe süzölmüştür. Üzerine 50ml olacak şekilde deiyonize su eklenip 4000 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda 2 ml bırakılarak süpernatant dikkatlice atılmış ve 2 ml çöküntü üzerine 30ml’ye tamamlayacak şekilde %2,5 Potassium dichromat solüsyonu eklenmiştir. Tüpler 30°C etüve konulup günde en az 5 kez steril bagetler yardımı ile karıştırılarak oksijen akışı sağlanmıştır. 4. günün sonunda tüpler tekrar oda ısısında 4000 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda 2ml bırakılarak süpernatant dikkatlice atılmıştır. Buradan alınan örnekler mikroskop altında sporulasyon açısından kontrol edilmiştir. Sporulasyonun yetersiz olması durumunda tüp üzerine tekrar 30ml olacak şekilde %2,5 Potasyum dicromat solüsyonu eklenmiş ve sporulasyona bırakılarak 7. gün tekrar kontrol edilmiştir (Şekil 3.3). Sporulasyon sonrası ookistler yoğunlaştırılarak digital görüntüleme sistemiyle mikroskopta incelenmiş ve protokol kayıtlarına göre görüntülenip ilgili teşhis anahtarlarına (8, 53-55) göre tür teşhisleri yapılmıştır.



Şekil 3.3 Sporlandırmaya alınan dışkı örnekleri

### 3.2.4 Dışkı Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

*Eimeria* ookistleriyle pozitif belirlenen dışkı örneklerinden genomik DNA izolasyonunda Lalonde ve Gajadhar (56) tarafından bildirilen tekniğin TÜBİTAK 113 O 597 kodlu ve “İç Anadolu Yöresinde Sığır Coccidiosisine Yol Açan Patojen *Eimeria* Türlerinin

Moleküler Karakterizasyonu ve Teşhiste Türe Özgü Real Time PCR Tekniğinin Geliştirilmesi” başlıklı araştırma projesi (50) kapsamında modifiye edilmiş versiyonu kullanılmıştır. Sporlandırılmış ve mikroskopik analizleri yapılmış örneklerden alınan yaklaşık 15 ml potasyum dichromatlı süspansiyon (~5gr dışkı örneği) steril gazlı bezler yardımıyla 50 ml steril falcon tüplere süzölmüş ve üzeri steril deiyonize su ile 50 ml’ye tamamlanmıştır. Tüpler 4500 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası dipteki tortu oynatılmadan süpernatant atılmış ve tüpler tekrar 50 ml steril deiyonize su ile tamamlanarak santrifüj işlemi aynen tekrar edilmiştir. Son santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tortu üzerine 10 ml steril doymuş şekerli su (Sheather's sugar solution; spesifik gravite: 1,27) ilave edilerek tortu çözödürölmüş ve homojen hale getirilmiştir. Süspansiyon daha sonra 15 ml santrifüj tüplerine aktarılmış ve doymuş şekerli su ile toplam hacim 15 ml’ye tamamlanmıştır. Tüpler 1500 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tüpler üzerinde doymuş şekerli su ile bombe oluşturularak lamel kapatılmış ve maksimum yoğunlaşma için 10 dk oda ısısında bekletilmiştir. Süre sonunda lamel kaldırılarak altındaki damla steril deiyonize su ile (toplam hacim 150 µl) 2 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine yıkanmıştır. Yıkama işlemleri sırasında tüplerin üzeri tekrar lamel ile kapatılmış ve 5 dk süre ile beklendikten sonra aynı hacimde aynı ependorf tüpler içerisine yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ependorf tüpler steril deiyonize su ile 2 ml’ye tamamlanarak ultra santrifüjde 15.300 rpm’de 3 dk santrifüj edilerek ookistlerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında dikkatlice süpernatant uzaklaştırılarak ependorf tüp içerisinde 120 µl hacimde ookist süspansiyonu bırakılmıştır. Genomik DNA izolasyonuna geçmeden önce her bir örneğe ait ookist süspansiyonu spin-vorteksenerek homojenize hale getirildikten sonra 10’ar µl iki kez örnek alınarak lam lamel arasında ışık mikroskopunda ookistlerin varlığı yönünden konfirme edilmiş ve ookist sayımı yapılmıştır. Sonraki basamakta, elde edilen ookist süspansiyonları 0,5 mm glass beads ile 5 dk homojenizatörde (Tissue Lyser LT; Qiagen) mekanik parçalanmaya tabii tutulmuştur. Sonrasında tüpler birer dakika olmak üzere 8 siklus sıvı azot ve kaynar suda tutularak ookistlerin parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra süspansiyon genomik DNA ekstraksiyon kitleri (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific; QIAamp DNA Micro Kit, Qiagen) ile DNA ekstraksiyonuna basamaklar modifiye edilerek alınmıştır. Final basamakta elüsyon 30 µl’ye ayarlanmıştır. Elde edilen genomik DNA ekstraktlarından alınan örnekler Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek DNA izolasyon etkinliği ve total genomik DNA

miktarları (ng/μl) belirlenmiştir. Örneklerle ait genomik DNA'lar kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.5 Ribosomal RNA Internal Transcribed Spacer 1 (ITS-1) Geninin Amplifikasyonu

Elde edilen genomik DNA ekstraktları, patojenik türler için spesifik olarak bildirilen (40), ITS-1 geninin *E. alabamensis* için 184 bp kısmını amplifiye eden 5'-CATTACACATTGTTCTTTCAG-3' forward ve 5'-GCTTCCAACTAA TGTTCTG-3' reverse; *E. auburnensis* için 295 bp kısmını amplifiye eden 5'-TAAAT TGGTGCGATGAGGGA-3' forward ve 5'-GCAATGAGAGAAAGATTTAATA-3' reverse; *E. bovis* için 238 bp kısmını amplifiye eden 5'-TCATAAAACATCAC CTCCAA-3' forward ve 5'-ATAATTGCGATAAGGGAGACA-3' reverse; *E. cylindrica* için 304 bp kısmını amplifiye eden 5'-GACATTTAAAA AACCGATTGGT-3' forward ve 5'-GGCTGCAATAAGATAGACATA-3' reverse; *E. ellipsoidalis* için 148 bp kısmını amplifiye eden 5'-CAACGTTTTTCCTTTTCCTATCA-3' forward ve 5'-ACTGCGATGAGAGAGAGCG-3' reverse; *E. zuernii* için 344 bp kısmını amplifiye eden 5'-AACATGTTTCTACCCACTAC-3' forward ve 5'-CGATAAGGAGG AGGACAAC-3' reverse primerleri ile PCR analizlerine tabii tutulmuştur. Reaksiyon karışımı her primer çifti için 25 μl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, [6 mM MgCl<sub>2</sub> 1. PCR; 3mM MgCl<sub>2</sub> 2. PCR], 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase ve 2 μl template DNA olarak hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 94 °C'de 3 dk; 35 siklus, denaturation: 94 °C'de 45 s, annealing: 55 °C'de 45 s, extension: 72 °C'de 1 dk; final extension: 72 °C'de 7 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; pozitif kontrol olarak Nippon Institute for Biological Science, Japonya'dan Dr. Fumiya Kawahara'dan temin edilen bazı patojenik *Eimeria* türlerine (*E. zuernii*, *E. bovis*, *E. alabamensis*, *E. auburnensis*) ait olduğunu belirledikleri genomik DNA örnekleri ile TÜBİTAK 113 O 597 kodlu ve "İç Anadolu Yöresinde Sığır Coccidiosisine Yol Açan Patojen *Eimeria* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Teşhiste Türe Özgü Real Time PCR Tekniğinin Geliştirilmesi" başlıklı araştırma projesi (50) kapsamında izole edilen referans plasmid DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 μl) % 1,5 'luk agaroz

jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

### 3.2.6 Patojenik *Eimeria* Türleri için TaqMan Real Time PCR Analizleri

*Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen dışkı örneklerinden elde edilmiş genomik DNA izolatlarında patojenik *Eimeria* türleri *E. zuernii*, *E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis* ve *E. ellipsoidalis*'in Real Time PCR'da kantitatif identifikasyonları için TÜBİTAK 113 O 597 kodlu ve "İç Anadolu Yöresinde Sığır Coccidiosisine Yol Açan Patojen *Eimeria* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Teşhiste Türe Özgü Real Time PCR Tekniğinin Geliştirilmesi" başlıklı araştırma projesi (50) kapsamında belirlenen spesifik primer ve prob dizileri (Tablo 3.2) kullanılmıştır.

**Tablo 3.2** Patojenik *Eimeria* türleri için primer ve prob sekansları

| <i>Eimeria</i> türü     | Primer/Prob |            | Dizilimi (5'---3')                    | TM* (°C) |
|-------------------------|-------------|------------|---------------------------------------|----------|
| <i>E. alabamensis</i>   | Primer      | E. alabF2  | CAGGACATGAAAGGTAATG                   | 50,8     |
|                         |             | E. alabR2  | TTCCCTGTTCAAAGGTTA                    | 50,2     |
|                         | Prob        | E. alabP2  | FAM-ACCTAGAACTCTTACAGATACACGAA-BHQ1   | 59,1     |
| <i>E. zuernii</i>       | Primer      | E. zuerF2  | CATCCAACCTCCTGATAG                    | 50,9     |
|                         |             | E. zuerR2  | CTTGGAATGCCATAAGG                     | 50,6     |
|                         | Prob        | E. zuerP2  | FAM-CACAACAGTAACTATCCACAACAGGC-BHQ1   | 62,2     |
| <i>E. bovis</i>         | Primer      | E. bovisF2 | CTACCCATATTCCATCCA                    | 49,7     |
|                         |             | E. bovisR2 | ACCACAGTTTTGGAAATG                    | 50,6     |
|                         | Prob        | E. bovisP2 | FAM- ACTATCCATAAGGCCACCAACTATCAG-BHQ1 | 62,1     |
| <i>E. auburnensis</i>   | Primer      | E. auburF2 | TGACCAATAAGGTTATATTATACA              | 54,1     |
|                         |             | E. auburR2 | GCCTTTTCTATTATCAACTCTA                | 51,1     |
|                         | Prob        | E. auburP2 | FAM- CCAAATCCCACCAACCACCG-BHQ1        | 61,5     |
| <i>E. ellipsoidalis</i> | Primer      | E.ellipsF2 | GCTCTTGGGTATCATTC                     | 50,0     |
|                         |             | E.ellipsR2 | CGGAACCTAAAGAATCAATAG                 | 50,1     |
|                         | Prob        | E.ellipsP2 | FAM- ATCCGACATATCCAACCTGGTAGT-BHQ1    | 59,3     |

Real Time PCR testinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; Nippon Institute for Biological Science, Japonya'dan Dr. Fumiya Kawahara'dan temin edilen bazı patojenik *Eimeria* türlerine (*E. zuernii*, *E. bovis*, *E. alabamensis*, *E. auburnensis*) ait olduğunu belirledikleri genomik DNA örnekleri ile TÜBİTAK 113 O 597 kodlu ve "İç Anadolu Yöresinde Sığır Coccidiosisine Yol Açan Patojen *Eimeria* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Teşhiste Türe Özgü Real

Time PCR Tekniğinin Geliştirilmesi” başlıklı araştırma projesi (50) kapsamında izole edilen referans plasmid DNA izolatları pozitif kontrol, sterilize edilmiş deiyonize su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Real Time PCR analizleri Stratagene Mx 3005P (Stratagene, Agilent Technologies, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR master mix (Luminaris Color Probe Low ROX qPCR Master Mix, Thermo Scientific) üreticinin açıklamalarına göre toplam 20 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

|                        |        |
|------------------------|--------|
| 2X Master Mix          | 10 µl  |
| Forward primer (10 µM) | 0,6 µl |
| Reverse primer (10 µM) | 0,6 µl |
| Probe (10 µM)          | 0,4 µl |
| Genomik DNA (50 ng)    | 1,0 µl |
| PCR Grade Deiyonize su | 7,4 µl |

TaqMan prob tabanlı Real Time PCR amplifikasyonu için termal profil 50°C 2dk 1 siklus, 95 °C 10dk 1 siklus ve 40 siklus 95 °C 15 sn, 60 °C 1 dk olarak ayarlanmıştır (Yıldırım ve ark., 2015). Real Time PCR analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler ve kantitatif değerler, amplifikasyon eğrileri ve Ct (dR) (Eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

### 3.2.7 18S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

*Eimeria* ookistleri yönünden pozitif belirlenen örneklerle ait genomik DNA izolatlarında 18S rRNA geninin spesifik amplifikasyonu için TÜBİTAK 113 O 597 kodlu ve “İç Anadolu Yöresinde Sığır Coccidiosisine Yol Açan Patojen *Eimeria* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Teşhiste Türe Özgü Real Time PCR Tekniğinin Geliştirilmesi” başlıklı araştırma projesi (50) kapsamında modifiye edilmiş olan Nested PCR tekniği uygulanmıştır. Nested PCR analizlerinin ilk basamağında ilgili gen bölgesinden 3312 bp kısmı amplifiye eden TK2 (5’-GGTTGATCCTGCCAGTAGTC-3’) ve ETS2 (5’-AATCCCAATGAACGCGACTCA-3’) primerleri (44), ikinci basamağında ise 1057 bp kısmı çoğaltan Eim18SEIF3 (5’-TCTATGGCTAATACATGCGSA-3’) (57) ve EMR2 (5’-TGAGTTTCCCCGTGT TGAGT-3’) primerleri (4) kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase olarak hazırlanmıştır. 1. PCR reaksiyonu için 3µl template

DNA, 2. PCR reaksiyonu için ise ilk reaksiyon sonucu elde edilen amplikondan 1 µl kullanılmıştır. Thermalcyclerda protokol birinci PCR basamağında initial denaturation: 95°C’de 4 dk; 40 siklus, denaturation: 95°C’de 30 s, annealing: 50,1°C’de 30 s, extension: 72°C’de 3 dk; final extension: 72°C’de 5 dk olarak ayarlanmıştır. İkinci PCR basamağında ise annealing 56,2°C çıkarılmış, extension basamağı ise aynı derecede 1dk olarak belirlenmiştir. Nested PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla yukarıda bahsedildiği gibi referens DNA izolatları ve sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 ’luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Upland, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

### 3.2.8 18S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması ve Plazmid DNA izolasyonu

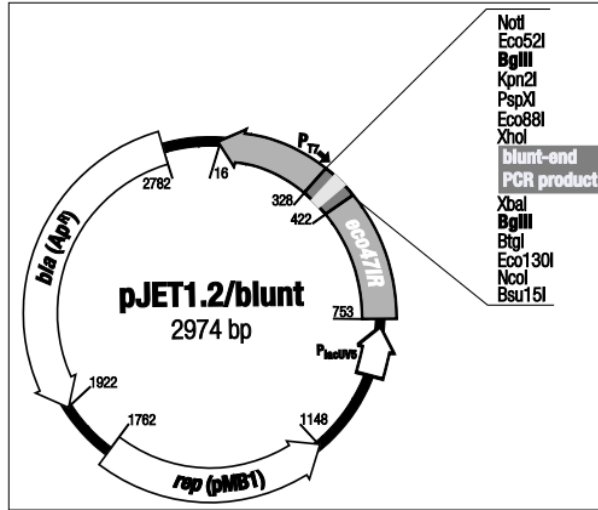
*Eimeria* türleri ile enfekte bulunan bazı pozitif örneklerle ait 18S rRNA gen bölgesi amplikonları jel pürifikasyon işlemleri sonrası sekans ve filogenetik analizler amacıyla klonlama ve plazmid pürifikasyon işlemlerine tabii tutulmuştur.

Klonlama prosedürlerinin ligasyon basamağında ilgili gen bölgesine ait amplikonlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Jel pürifiye örneklerin klonlanmasında CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyonu üreticinin açıklamaları doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

|                     |                   |
|---------------------|-------------------|
| 2X Reaction Buffer  | 10 µl             |
| PCR product         | 1-5 µl (~10ng/µl) |
| Nuclease free water | 17 µl’ye kadar    |
| DNA Blunting Enzyme | 1 µl              |
| Toplam              | 18 µl             |

Hazırlanan karışım vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70°C’de su banyosunda 5 dk inkübe edilerek hemen buz üstüne alınmıştır. Karışım üzerine daha sonra 1 µl pJET1.2/blunt CloningVector (50 ng/ µl) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklenerek son hacmi 20

$\mu$ l'ye tamamlanmıştır. Karışım 25 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5  $\mu$ l'si transformasyon için kullanılmıştır. pJET1.2/blunt Cloning Vector haritası Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4 pJET1.2/blunt cloningvector haritası

Klonlama prosedürünün transformasyon basamağında 5  $\mu$ L'lik ligasyon ürünü buz üzerinde tutulan *E. coli* TOP 10 hücreleri üzerine eklenmiş ve buz üzerinde 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Sonra hücreler önce 42°C'de 2 dk daha sonra buz üzerinde 4 dk bekletildikten sonra üzerine 250  $\mu$ L SOC Medium eklenmiştir. 37°C'de çalkalayıcı üzerinde 1,5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı uygun konsantrasyonda ampicilin ihtiva eden LB (Lurie-Bertani) katı besi yerine ekilerek kolonilerin gelişimi için bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir. LB katı besi yerinde üreyen kolonilerden (Şekil 3.5) farklı *Eimeria* türlerine ait hedef DNA'ların insert olabileceği göz önüne alınarak en az 8 koloni seçilmiş ve steril pipet uçları ile bu koloniler alınarak işaretlenmiş LB katı besi yeri içeren pleytler üzerine (her pleyt dörde bölünerek her bölmeye bir koloni geçilmiştir) tekrar ekilerek 37°C'de 1 gece daha inkübasyona bırakılmıştır.



**Şekil 3.5** LB katı besiyerinde üreyen koloniler

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plasmidi içerip içermediğini anlamak için aynı koloniye ait her bir işaretlenmiş bölgeden tek bir koloni seçilerek koloni secreening PCR yapılmıştır. Koloni PCR’da vektör spesifik pJET1.2 forward ve pJET1.2 reverse primerleri (Thermo Scientific) kullanılmıştır. PCR sonucu oluşan ampliconlar %1.5’luk agaroz jelde yürütülüp görüntülenmiş ve vektör+insert varlığı yönünden konfirmasyonu sağlanmıştır.

Vektör+insert varlığı yönünden konfirme edilen kolonilerden (İşaretlenmiş pleytlerde aynı bölmede bulunan koloniler) en az iki adedi seçilerek steril özeler ile alınmış ve uygun konsantrasyonda ampicilin ihtiva eden 5 ml hacimde LB sıvı besiyerlerine ekimleri yapılarak 37°C’de çalkalayıcı üzerinde bir gece inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.6).



**Şekil 3.6** Kolonilerin LB sıvı besiyerinde üretilmesi

Sıvı besi yerinde üretilen hücrelerden 2 ml alınarak 8000 rpm’de 2 dk santrifüj işlemine tabii tutulmuş ve hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım dökülüp hücresel pelet GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) ile plazmid pürifikasyonuna alınmış, aynı örneklerle ait diğer bir kısım hücresel pelletler ihtiyaç halinde kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza altına alınmıştır. Elde edilen plazmidler insertlerin varlığı yönünden XbaI ve Aval (Thermo Scientific) restriksiyon enzimleri ile prosedürüne uygun olarak analize tabi tutulmuştur.

### 3.2.9 18S rRNA Gen Bölgesinin Sekans ve Filogenetik Analizi

18S rRNA gen bölgesi için elde edilmiş olan plazmid DNA’lar vektör spesifik pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious R8 (58) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin ikili hizalamaları yapılarak, vektör nükleotid dizisi içerisinde, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlenerek izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların Geneious R8 yazılımı üzerinden BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması kullanılarak GenBank’ta mevcut homologları ile çoklu hizalama analizleri yapıldıktan sonra GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir. En uygun nükleotid substitüsyon modelinin hesaplanmasında model test verilerinden yararlanılmıştır. Hesaplama sonucu en düşük AIC (Akaike Information Criterion, corrected) puanına sahip model olan Kimura 2-parameter modeli filogenetik ağacın çizilmesinde en uygun model olarak belirlenmiştir. Filogenetik ağacın çizilmesinde Maximum Likelihood algoritmasından yararlanılmıştır. Filogenetik analizler, Mega 6 (59) yazılımında gerçekleştirilmiştir. Bootstrap değeri 1000 replikasyon olarak alınmıştır.

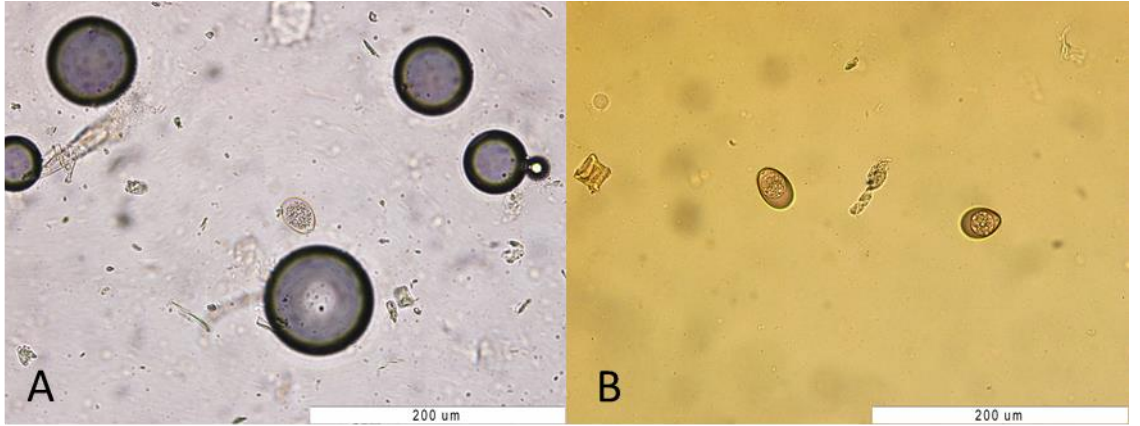
### 3.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistik analizler IBM SPSS Statistics 20 yazılımında gerçekleştirilmiştir. İncelenen sığırlarda coccidiosis prevalansı ile yaş, cinsiyet, ırk ve dışkı karakteri faktörlerinin ilişkisi, Fisher’s Exact ve Pearson’s Chi Square testleriyle araştırılmıştır. *Eimeria* ookistleri yönünden pozitif örneklerde OPG değerleri ve DNA kopya sayısı bazında Real Time PCR’da belirlenen eşik değer siklusları (Ct(dR)) ile *Eimeria* türü, yaş, cinsiyet ve ırk faktörlerinin ilişkisi Independent Samples T ve ANOVA testiyle araştırılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1 KONVANSİYONEL DIŞKI MUAYENESİ SONUÇLARI

Konvansiyonel dışkı muayenesi sonucunda, incelemesi yapılan toplam 150 sığırın 98'i (%65,3) *Eimeria* ookistleri yönünden pozitif bulunmuştur. *Eimeria* ookistlerini saptama amacıyla direkt dışkı örnekleri ve potassium dichromatlı örnekler üzerinde kullanılan iki yöntem ile de örneklerde *Eimeria* oocystsleri belirlenirken (Şekil 4.1) birim sahadaki ookist yoğunluğu ve kaba partiküllerin eliminasyonu yönünden potassium dichromatlı örnekler üzerine uygulanan modifiye tekniğin daha etkin olduğu belirlenmiştir. *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen örneklerin sığırların yaş, cinsiyet ve ırkı ile dışkı karakterine göre dağılımları Tablo 4.1'de verilmiştir.



**Şekil 4.1** Dışkı örneklerinde *Eimeria* ookistleri, A: Direkt dışkı örneklerine uygulanan yöntem; B: Potassium dichromatlı örneklere uygulanan modifiye yöntem

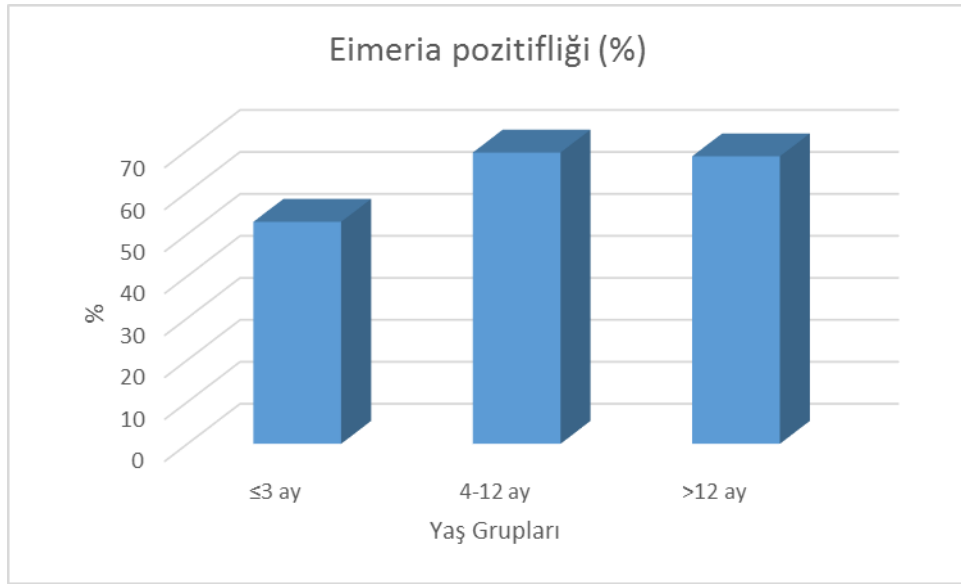
**Tablo 4.1** *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen örneklerin sığırların yaş, cinsiyet ve ırkı ile dışkı karakterine göre dağılımları

| Faktör  |          |    |      |      |    |      |          |    |      |          |    |      |          |    |      |                 |    |      |         |    |       |               |    |       |        |    |      |
|---------|----------|----|------|------|----|------|----------|----|------|----------|----|------|----------|----|------|-----------------|----|------|---------|----|-------|---------------|----|-------|--------|----|------|
|         | Cinsiyet |    |      |      |    |      | İrk      |    |      |          |    |      |          |    |      | Dışkı Karakteri |    |      |         |    |       |               |    |       | Toplam |    |      |
|         | Erkek    |    |      | Dişi |    |      | Holstein |    |      | Simental |    |      | Montofon |    |      | Normal          |    |      | İshalli |    |       | Kanlı ishalli |    |       |        |    |      |
|         | İH       | PH | %    | İH   | PH | %    | İH       | PH | %    | İH       | PH | %    | İH       | PH | %    | İH              | PH | %    | İH      | PH | %     | İH            | PH | %     | İH     | PH | %    |
| Yaş     |          |    |      |      |    |      |          |    |      |          |    |      |          |    |      |                 |    |      |         |    |       |               |    |       |        |    |      |
| ≤3 ay   | 16       | 8  | 50,0 | 18   | 10 | 55,5 | 13       | 7  | 53,8 | 12       | 7  | 58,3 | 9        | 4  | 44,4 | 24              | 8  | 33,3 | 7       | 7  | 100,0 | 3             | 3  | 100,0 | 34     | 18 | 52,9 |
| 4-12 ay | 20       | 15 | 15,0 | 42   | 28 | 66,6 | 21       | 15 | 71,4 | 22       | 15 | 68,1 | 19       | 13 | 68,4 | 57              | 39 | 68,4 | 4       | 3  | 75,0  | 1             | 1  | 100,0 | 62     | 43 | 69,4 |
| >12 ay  | 23       | 15 | 65,2 | 31   | 22 | 70,9 | 30       | 20 | 66,6 | 18       | 14 | 77,7 | 6        | 3  | 50,0 | 53              | 37 | 69,8 | 1       | 0  | 0,0   | 0             | 0  | 0,0   | 54     | 37 | 68,5 |
| Toplam  | 59       | 38 | 64,4 | 91   | 60 | 65,9 | 64       | 42 | 65,6 | 52       | 36 | 69,2 | 34       | 20 | 58,8 | 133             | 84 | 62,7 | 12      | 10 | 83,3  | 4             | 4  | 100,0 | 150    | 98 | 65,3 |

İH: İncelenen hayvan sayısı

PH: Pozitif hayvan sayısı

Tablo 4.1’de görüleceği üzere yaş gruplarına göre *Eimeria* ookistleri ile pozitiflik en yüksek %69,4 ile 4-12 ay grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla %68,5 ve %52,9 ile >12 ay ve  $\leq 3$  ay grupları izlemiştir. Sığırların yaş gruplarına göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı ayrıca Şekil 4.2’de verilmiştir. Yaş gruplarına göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımında istatistiksel açıdan (Tablo 4.2) önemli bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

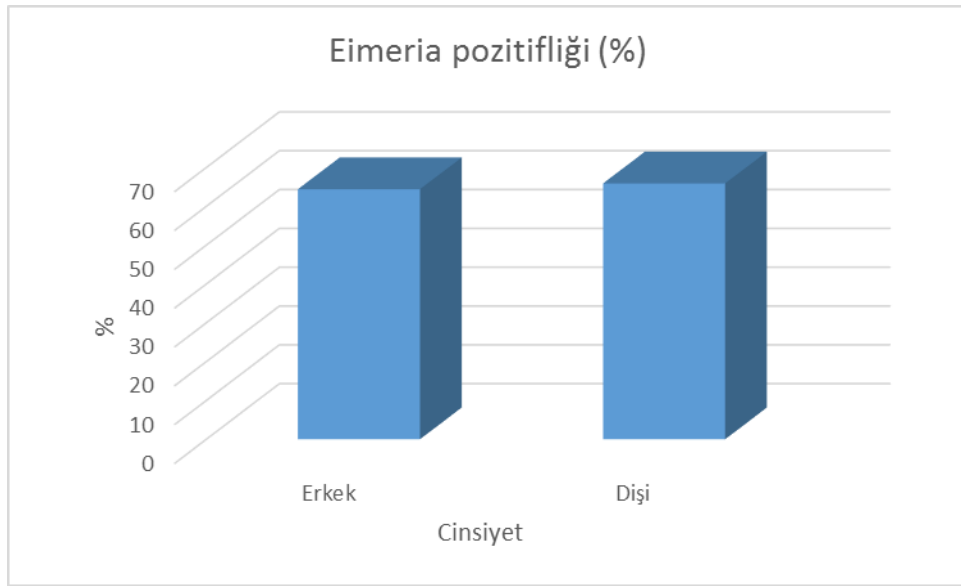


Şekil 4.2 Sığırların yaş gruplarına göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı

Tablo 4.2 Yaş gruplarına göre *Eimeria* pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

| Ki-Kare Testi        |       |    |                       |
|----------------------|-------|----|-----------------------|
|                      | Değer | df | Asymp. Sig. (2-yönlü) |
| Pearson Chi-Square   | 2,990 | 2  | ,224                  |
| Likelihood Oranı     | 2,905 | 2  | ,234                  |
| Linear-Linear İlişki | 1,809 | 1  | ,179                  |
| Geçerli olgu sayısı  | 150   |    |                       |

Sığırların cinsiyetine göre erkeklerde %64,4 dişilerde ise %65,9 oranında *Eimeria* pozitifliği belirlenmiştir. Sığırların cinsiyetine göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı ayrıca Şekil 4.3’de verilmiştir. Cinsiyete göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımında istatistiksel açıdan (Tablo 4.3) önemli bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

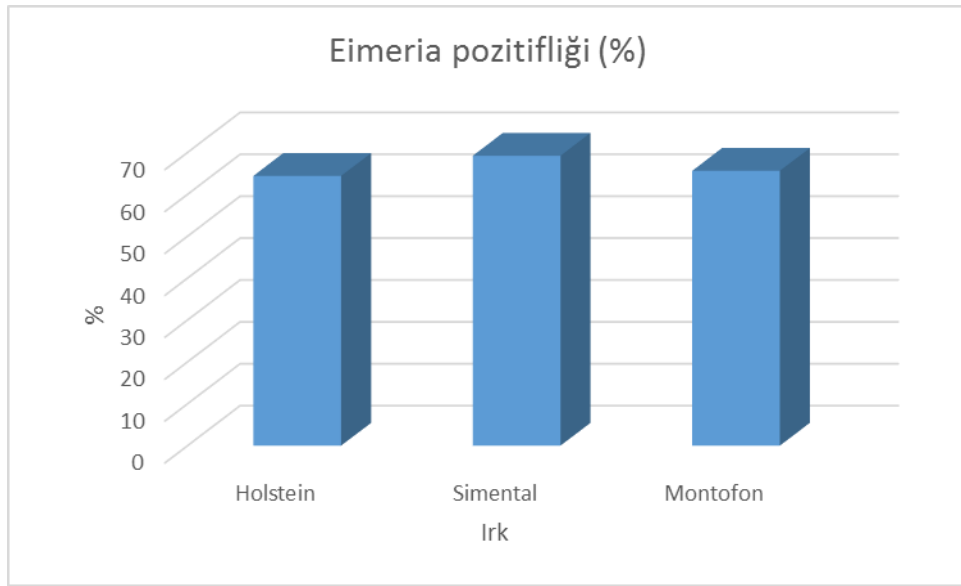


Şekil 4.3 Sığırların cinsiyetine göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı

Tablo 4.3 Sığırların cinsiyetine göre *Eimeria* pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

| Ki-Kare Testi                      |                   |    |                       |                      |                      |
|------------------------------------|-------------------|----|-----------------------|----------------------|----------------------|
|                                    | Değer             | df | Asymp. Sig. (2-yönlü) | Exact Sig. (2-yönlü) | Exact Sig. (2-yönlü) |
| Pearson Chi-Square                 | ,037 <sup>a</sup> | 1  | ,848                  |                      |                      |
| Continuity Correction <sup>b</sup> | ,000              | 1  | ,987                  |                      |                      |
| Likelihood Oranı                   | ,037              | 1  | ,848                  |                      |                      |
| Fisher's Exact Test                |                   |    |                       | ,862                 | ,492                 |
| Linear-Linear İlişki               | ,037              | 1  | ,848                  |                      |                      |
| Geçerli olgu sayısı                | 150               |    |                       |                      |                      |

Holstein, Simental ve Montofon ırkına ait örneklerde *Eimeria* pozitifliği sırasıyla %65,6, %69,2 ve %58,8 oranında saptanmıştır. Sığırların ırkına göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı ayrıca Şekil 4.4’de verilmiştir. Irka göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımında istatistiksel açıdan (Tablo 4.4) önemli bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

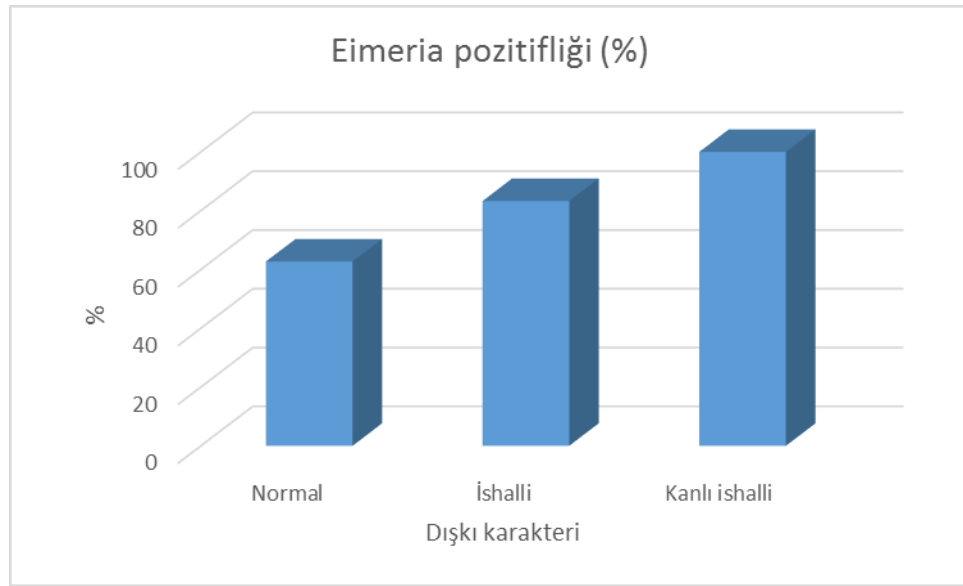


Şekil 4.4 Sığırların ırkına göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı

**Tablo 4.4** Sığırların ırkına göre *Eimeria* pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

| Ki-Kare Testi        |                   |    |                       |
|----------------------|-------------------|----|-----------------------|
|                      | Değer             | df | Asymp. Sig. (2-yönlü) |
| Pearson Chi-Square   | ,987 <sup>a</sup> | 2  | ,610                  |
| Likelihood Oranı     | ,978              | 2  | ,613                  |
| Linear-Linear İlişki | ,275              | 1  | ,600                  |
| Geçerli olgu sayısı  | 150               |    |                       |

Dışkı karakterine göre normal, ishalli ve kanlı ishalli dışkı örneklerinde *Eimeria* pozitifliği sırasıyla %62,7, %83,3 ve %100.0 oranında bulunmuştur. Sığırların ırkına göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı ayrıca Şekil 4.5’de verilmiştir. Dışkı karakterine göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımında istatistiksel açıdan (Tablo 4.5) önemli bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4.5** Sığırlarda dışkı karakterine göre *Eimeria* pozitifliğinin dağılımı

**Tablo 4.5** Dışkı karakterine göre *Eimeria* pozitifliğinin istatistiksel analizi (IBM SPSS Statistics v20)

| Ki-Kare Testi        |                    |    |                       |
|----------------------|--------------------|----|-----------------------|
|                      | Value              | df | Asymp. Sig. (2-yönlü) |
| Pearson Chi-Square   | 4,254 <sup>a</sup> | 2  | ,119                  |
| Likelihood Oranı     | 5,753              | 2  | ,056                  |
| Linear-Linear İlişki | 4,213              | 1  | ,040                  |
| Geçerli olgu sayısı  | 150                |    |                       |

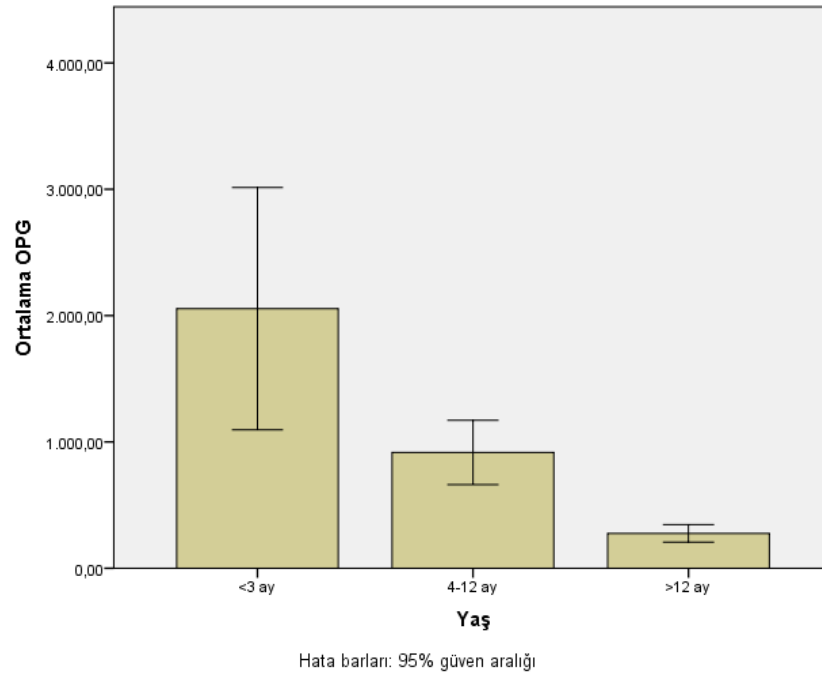
## 4.2 GRAM DIŞKIDAKİ OOKİST SAYISI (OPG) VE İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

*Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen 98 sığırdaki ortalama OPG değeri  $883,8 \pm 1166,2$  (min:50,00, max:5666,10) belirlenmiştir. OPG değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılımları Tablo 4.6’da verilmiştir. Tablo 4.6’da görüleceği üzere ortalama OPG değeri en yüksek <3 ay grubunda belirlenmiş, bunu 4-12 ay ve >12 ay yaş grupları izlemiştir (Şekil 4.6). >12 ay yaş grubu ile <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli ( $p < 0,05$ ) bulunurken <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları arasındaki farklılık önemsiz ( $p > 0,05$ ) belirlenmiştir (Tablo 4.7)

**Tablo 4.6** *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımı

| Yaş Grubu |            | İstatistik | Bootstrap <sup>a</sup> |                   |        |
|-----------|------------|------------|------------------------|-------------------|--------|
|           |            |            | Std. Hata              | 95% Güven aralığı |        |
|           |            |            |                        | Alt               | Üst    |
| <3 ay     | N          | 18         | 4                      | 11                | 25     |
|           | Ortalama   | 2054,4     | 473,4                  | 1084,1            | 2948,2 |
|           | Std. Sapma | 1928,2     | 256,5                  | 1280,3            | 2318,4 |
|           | Std. Hata  | 454,5      |                        |                   |        |
|           | Minimum    | 50,0       |                        |                   |        |
|           | Maksimum   | 5666,1     |                        |                   |        |
| 4-12 ay   | N          | 43         | 5                      | 34                | 53     |
|           | Ortalama   | 916,6      | 122,0                  | 685,4             | 1186,3 |
|           | Std. Sapma | 828,0      | 128,8                  | 561,5             | 1058,9 |
|           | Std. Hata  | 126,3      |                        |                   |        |
|           | Minimum    | 50,0       |                        |                   |        |
|           | Maksimum   | 3666,3     |                        |                   |        |
| >12 ay    | N          | 37         | 5                      | 28                | 47     |
|           | Ortalama   | 276,1      | 35,2                   | 210,8             | 353,4  |
|           | Std. Sapma | 206,8      | 18,4                   | 163,4             | 238,0  |
|           | Std. Hata  | 34,0       |                        |                   |        |
|           | Minimum    | 50,0       |                        |                   |        |
|           | Maksimum   | 666,6      |                        |                   |        |
| Toplam    | N          | 98         | 0                      | 98                | 98     |
|           | Ortalama   | 883,8      | 118,0                  | 657,5             | 1120,4 |
|           | Std. Sapma | 1166,1     | 160,7                  | 802,4             | 1444,5 |
|           | Std. Hata  | 117,8      |                        |                   |        |
|           | Minimum    | 50,0       |                        |                   |        |
|           | Maksimum   | 5666,1     |                        |                   |        |

<sup>a</sup> Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır



**Şekil 4.6** OPG değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği

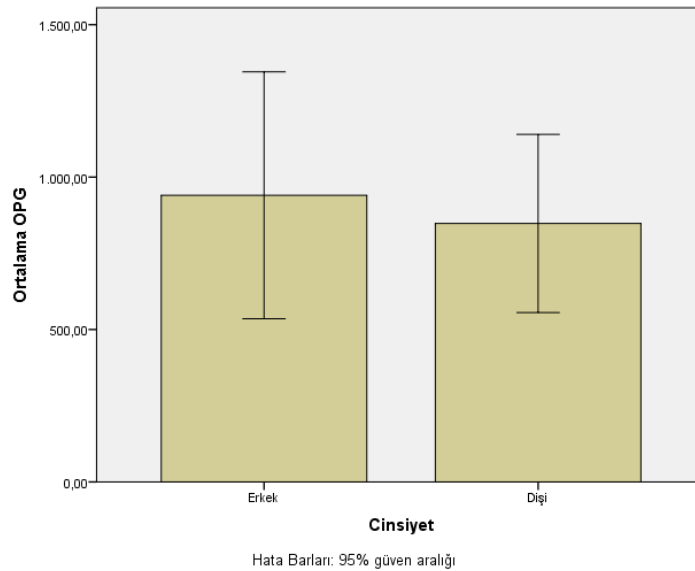
**Tablo 4.7** Sığırlarda OPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımının istatistiksel analizi

|                                                 | (I) Yaş | (J) Yaş | Ortalama<br>farklılık (I-J) | Std. Hata | Sig. | 95% Güven aralığı |           |
|-------------------------------------------------|---------|---------|-----------------------------|-----------|------|-------------------|-----------|
|                                                 |         |         |                             |           |      | Alt sınır         | Üst sınır |
| Tamhane                                         | <3 ay   | 4-12 ay | 1137,84942                  | 471,68336 | ,075 | -92,5761          | 2368,2749 |
|                                                 |         | >12 ay  | 1778,32500*                 | 455,73986 | ,003 | 573,5016          | 2983,1484 |
|                                                 | 4-12 ay | <3 ay   | -1137,84942                 | 471,68336 | ,075 | -2368,2749        | 92,5761   |
|                                                 |         | >12 ay  | 640,47558*                  | 130,75858 | ,000 | 316,9932          | 963,9580  |
|                                                 | >12 ay  | <3 ay   | -1778,32500*                | 455,73986 | ,003 | -2983,1484        | -573,5016 |
|                                                 |         | 4-12 ay | -640,47558*                 | 130,75858 | ,000 | -963,9580         | -316,9932 |
| *. Ortalama farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir. |         |         |                             |           |      |                   |           |

Sığırların cinsiyetine göre OPG değerleri dişilerde 848,0, erkeklerde ise 940,0 saptanmıştır (Tablo 4.8). OPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımında (Şekil 4.7) istatistiksel bir farklılık ( $p>0,05$ ) görülmemiştir (Tablo 4.9).

**Tablo 4.8** *Eimeria* oocistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin cinsiyete göre dağılımı

| Cinsiyet |            | İstatistik | Bootstrap <sup>a</sup> |                   |            |
|----------|------------|------------|------------------------|-------------------|------------|
|          |            |            | Std. Hata              | 95% Güven aralığı |            |
|          |            |            |                        | Alt               | Üst        |
| Erkek    | N          | 38         |                        |                   |            |
|          | Ortalama   | 940,2579   | 197,4129               | 581,9349          | 1362,8412  |
|          | Std. Sapma | 1231,66611 | 255,57556              | 708,24218         | 1689,91328 |
|          | Std. Hata  | 199,80263  |                        |                   |            |
| Dişi     | N          | 60         |                        |                   |            |
|          | Ortalama   | 847,9717   | 143,8572               | 591,2975          | 1162,1831  |
|          | Std. Sapma | 1131,83983 | 197,72611              | 678,09105         | 1489,19400 |
|          | Std. Hata  | 146,11989  |                        |                   |            |

<sup>a</sup> Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır**Şekil 4.7** OPG değerlerinin sığırların cinsiyetine göre dağılım grafiği**Tablo 4.9** Sığırlarda OPG değerlerinin yaş gruplarına göre dağılımının istatistiksel analizi

|     | Ortalamaların eşitliği için t-testi |        |                   |                       |                        |                                  |           |
|-----|-------------------------------------|--------|-------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------------|-----------|
|     | t                                   | df     | Sig. (2-<br>uçlu) | Ortalama<br>farklılık | Std. Hata<br>farklılık | Farklılık için 95% Güven aralığı |           |
|     |                                     |        |                   |                       |                        | Alt                              | Üst       |
| OPG | ,373                                | 73,904 | ,710              | 92,28623              | 247,53204              | -400,94279                       | 585,51524 |

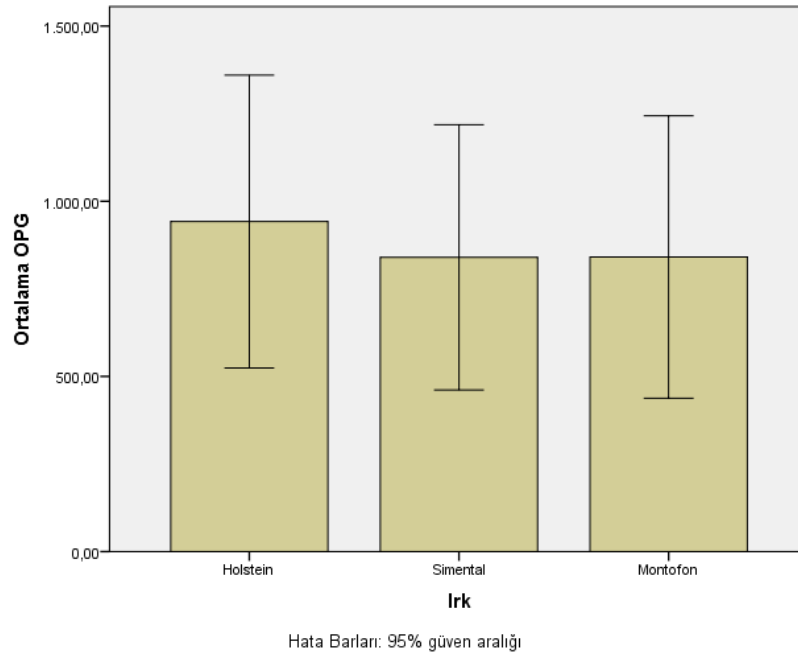
OPG değerlerinin sığırların ırkına göre dağılımları Tablo 4.10’da verilmiştir. Tablo 4.10’da görüleceği üzere ortalama OPG değeri Holstein, Simental ve Montofon ırkı

sığırlarda sırasıyla 942,0, 839,7 ve 840,8 belirlenmiştir. OPG değerlerinin sığırların ırkına göre dağılımında (Şekil 4.8) istatistiksel bir farklılık ( $p>0,05$ ) görülmemiştir (Tablo 4.11).

**Tablo 4.10** *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin ırka göre dağılımı

|          |            | İstatistik | Bootstrap <sup>a</sup> |                   |            |
|----------|------------|------------|------------------------|-------------------|------------|
|          |            |            | Std. Hata              | 95% Güven aralığı |            |
|          |            |            |                        | Alt               | Üst        |
| Holstein | N          | 42         | 5                      | 33                | 52         |
|          | Ortalama   | 941,9702   | 211,0046               | 554,3888          | 1361,6825  |
|          | Std. Sapma | 1341,26479 | 258,81830              | 744,83266         | 1755,06014 |
|          | Std. Hata  | 206,96165  |                        |                   |            |
|          | Minimum    | 50,00      |                        |                   |            |
|          | Maksimum   | 5666,10    |                        |                   |            |
| Simental | N          | 36         | 5                      | 26                | 46         |
|          | Ortalama   | 839,7319   | 179,8054               | 522,5359          | 1216,7566  |
|          | Std. Sapma | 1118,86697 | 241,27067              | 617,74624         | 1533,61544 |
|          | Std. Hata  | 186,47783  |                        |                   |            |
|          | Minimum    | 50,00      |                        |                   |            |
|          | Maksimum   | 5166,15    |                        |                   |            |
| Montofon | N          | 20         | 4                      | 13                | 28         |
|          | Ortalama   | 840,7500   | 200,7455               | 479,3938          | 1292,7218  |
|          | Std. Sapma | 861,05403  | 215,44133              | 381,08680         | 1197,16750 |
|          | Std. Hata  | 192,53753  |                        |                   |            |
|          | Minimum    | 50,00      |                        |                   |            |
|          | Maksimum   | 3333,00    |                        |                   |            |
| Toplam   | N          | 98         | 0                      | 98                | 98         |
|          | Ortalama   | 883,7561   | 120,8903               | 666,2694          | 1143,9140  |
|          | Std. Sapma | 1166,14538 | 154,11066              | 854,44849         | 1465,26939 |
|          | Std. Hata  | 117,79847  |                        |                   |            |
|          | Minimum    | 50,00      |                        |                   |            |
|          | Maksimum   | 5666,10    |                        |                   |            |

<sup>a</sup> Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır



Şekil 4.8 OPG değerlerinin sığırların ırkına göre dağılım grafiği

Tablo 4.11 Sığırlarda OPG değerlerinin ırka göre dağılımının istatistiksel analizi

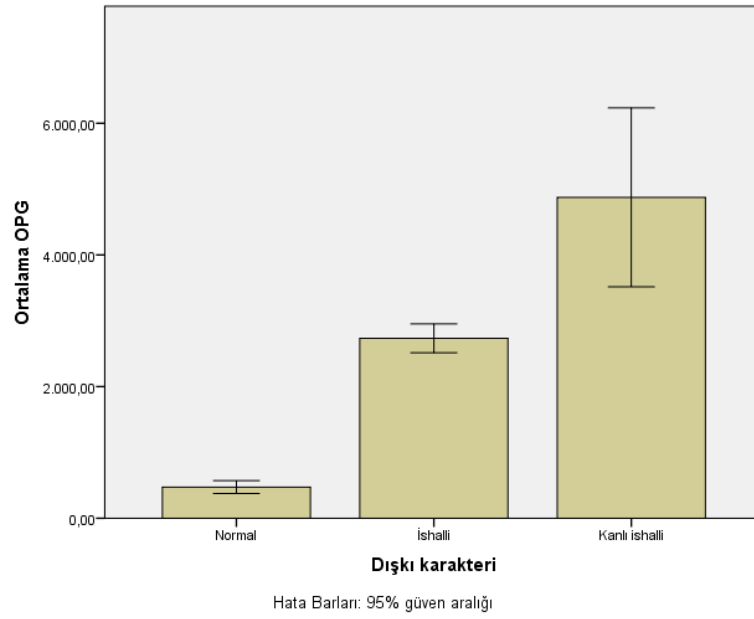
| Çoklu Kıyaslama                                 |          |          |                          |           |       |                   |           |
|-------------------------------------------------|----------|----------|--------------------------|-----------|-------|-------------------|-----------|
| Bağımlı değişken: OPG                           |          |          |                          |           |       |                   |           |
|                                                 | (I) Irk  | (J) Irk  | Ortalama Farklılık (I-J) | Std. Hata | Sig.  | 95% Güven aralığı |           |
|                                                 |          |          |                          |           |       | Alt sınır         | Üst sınır |
| Tamhane                                         | Holstein | Simental | 102,23829                | 278,58052 | ,977  | -577,9245         | 782,4011  |
|                                                 |          | Montofon | 101,22024                | 282,67265 | ,978  | -595,0837         | 797,5242  |
|                                                 | Simental | Holstein | -102,23829               | 278,58052 | ,977  | -782,4011         | 577,9245  |
|                                                 |          | Montofon | -1,01806                 | 268,03858 | 1,000 | -663,9781         | 661,9420  |
|                                                 | Montofon | Holstein | -101,22024               | 282,67265 | ,978  | -797,5242         | 595,0837  |
|                                                 |          | Simental | 1,01806                  | 268,03858 | 1,000 | -661,9420         | 663,9781  |
| *. Ortalama farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir. |          |          |                          |           |       |                   |           |

OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımları Tablo 4.12’da verilmiştir. Tablo 4.12’da görüleceği üzere ortalama OPG değeri en yüksek kanlı ishelli dışkılarda belirlenmiş bunu ishelli ve normal dışkı örnekleri izlemiştir. OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımında (Şekil 4.9) her üç kategori için de istatistiksel farklılık önemli ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur (Tablo 4.13).

**Tablo 4.12** *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımı

|               |            | İstatistik | Bootstrap <sup>a</sup> |                   |                |
|---------------|------------|------------|------------------------|-------------------|----------------|
|               |            |            | Std. Hata              | 95% Güven aralığı |                |
|               |            |            |                        | Alt               | Üst            |
| Normal        | N          | 84         | 4                      | 77                | 90             |
|               | Ortalama   | 473,5649   | 49,1526                | 380,6016          | 573,5359       |
|               | Std. Sapma | 450,44972  | 40,75718               | 361,69531         | 522,63305      |
|               | Std. Hata  | 49,14809   |                        |                   |                |
|               | Minimum    | 50,00      |                        |                   |                |
|               | Maksimum   | 1833,15    |                        |                   |                |
| İshalli       | N          | 10         | 3                      | 5                 | 16             |
|               | Ortalama   | 2733,0600  | 94,9660                | 2560,3500         | 2937,1004      |
|               | Std. Sapma | 306,28156  | 65,59677               | 154,05397         | 405,14313      |
|               | Std. Hata  | 96,85473   |                        |                   |                |
|               | Minimum    | 2333,10    |                        |                   |                |
|               | Maksimum   | 3333,00    |                        |                   |                |
| Kanlı ishalli | N          | 4          | 2                      | 1                 | 9 <sup>b</sup> |
|               | Ortalama   | 4874,5125  | 439,8235               | 3666,3000         | 5666,1000      |
|               | Std. Sapma | 853,82717  | 334,55229              | ,00000            | 1154,58507     |
|               | Std. Hata  | 426,91359  |                        |                   |                |
|               | Minimum    | 3666,30    |                        |                   |                |
|               | Maksimum   | 5666,10    |                        |                   |                |
| Toplam        | N          | 98         | 0                      | 98                | 98             |
|               | Ortalama   | 883,7561   | 119,3997               | 658,1287          | 1121,2309      |
|               | Std. Sapma | 1166,14538 | 155,98915              | 848,64567         | 1456,55520     |
|               | Std. Hata  | 117,79847  |                        |                   |                |
|               | Minimum    | 50,00      |                        |                   |                |
|               | Maksimum   | 5666,10    |                        |                   |                |

<sup>a</sup> Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır



**Şekil 4.9** OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılım grafiği

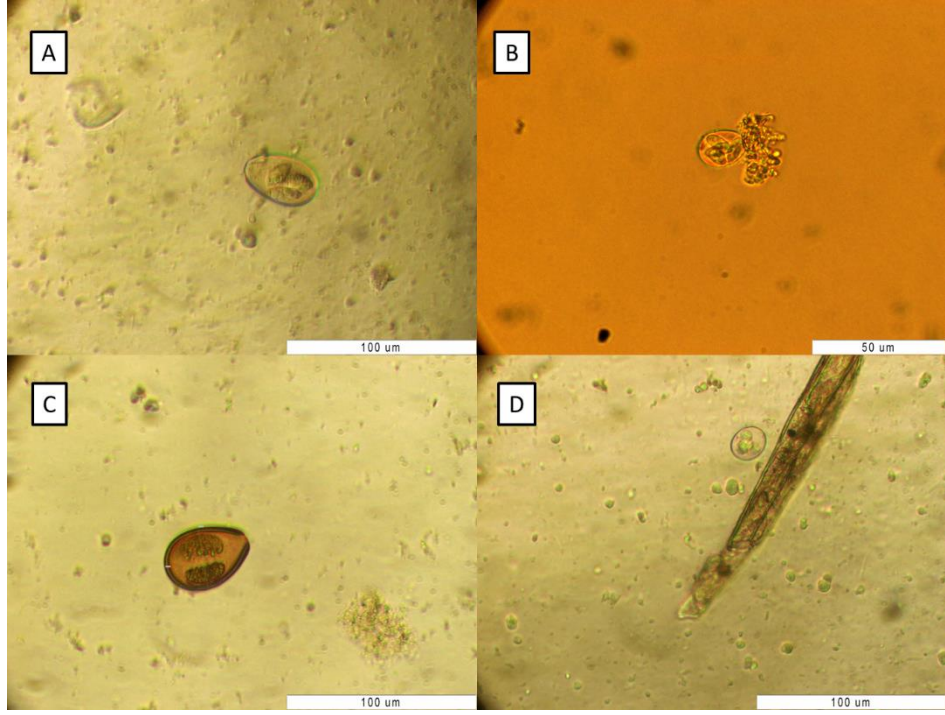
**Tablo 4.13** Sığırlarda OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımının istatistiksel analizi

| (I) Dışkı karakteri | (J) Dışkı karakteri | Ortalama Farklılık (I-J) | Std. Hata | Sig. | 95% Güven aralığı |            |
|---------------------|---------------------|--------------------------|-----------|------|-------------------|------------|
|                     |                     |                          |           |      | Alt sınır         | Üst sınır  |
| Normal              | İshalli             | -2259,49512*             | 108,61112 | ,000 | -2553,3716        | -1965,6186 |
|                     | Kanlı ishalli       | -4400,94762*             | 429,73334 | ,005 | -6430,2105        | -2371,6848 |
| İshalli             | Normal              | 2259,49512*              | 108,61112 | ,000 | 1965,6186         | 2553,3716  |
|                     | Kanlı ishalli       | -2141,45250*             | 437,76255 | ,038 | -4094,2006        | -188,7044  |
| Kanlı ishalli       | Normal              | 4400,94762*              | 429,73334 | ,005 | 2371,6848         | 6430,2105  |
|                     | İshalli             | 2141,45250*              | 437,76255 | ,038 | 188,7044          | 4094,2006  |

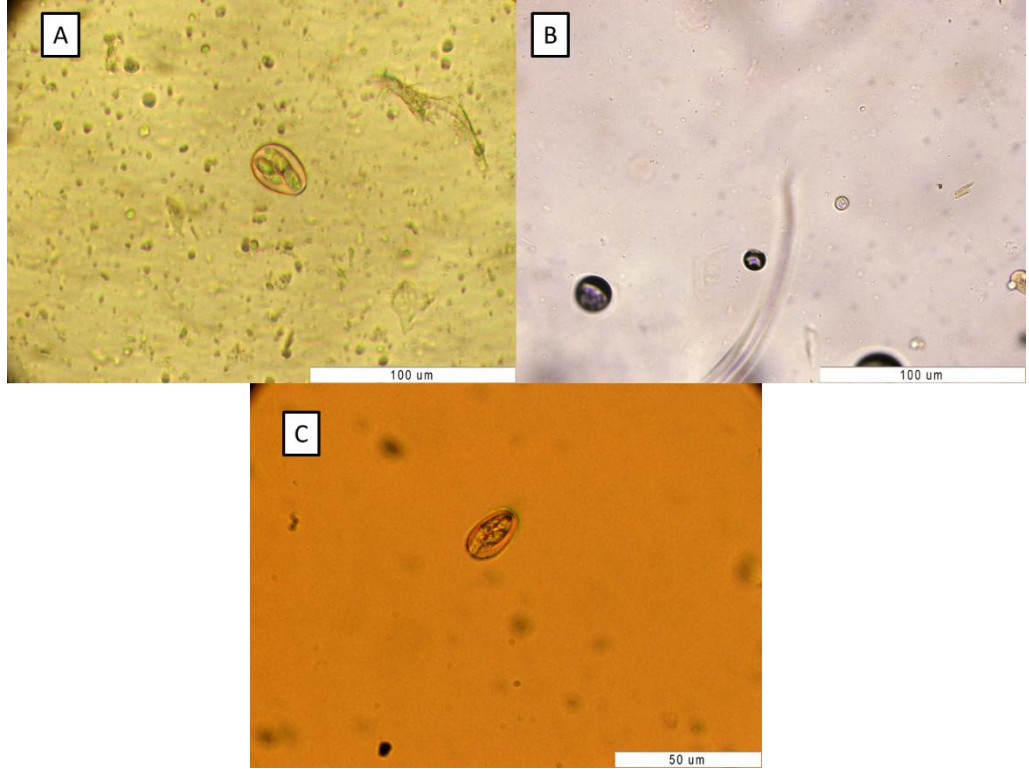
\*. Ortalama farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

### 4.3 MORFOLOJİK İDENTİFİKASYON SONUÇLARI

*Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen sığırlarda sporlandırma sonucu identifiye edilen türlere ait ookist şekilleri Şekil 4.10-4.11’de gösterilmiştir. Saptanan *Eimeria* türleri ve prevalansları Tablo 4.14’de verilmiş olup en yaygın tür %76,5 ile *E. bovis* bulunmuş bunu sırasıyla %64,3 ile *E. zuernii*, %51,0 ile *E. auburnensis*, %44,9 ile *E. alabamensis*, %16,3 ile *E. cylindrica*, %6,1 ile *E. bukidnonensis* ve %4,1 ile *E. subspherica* izlemiştir (Şekil 4.12).



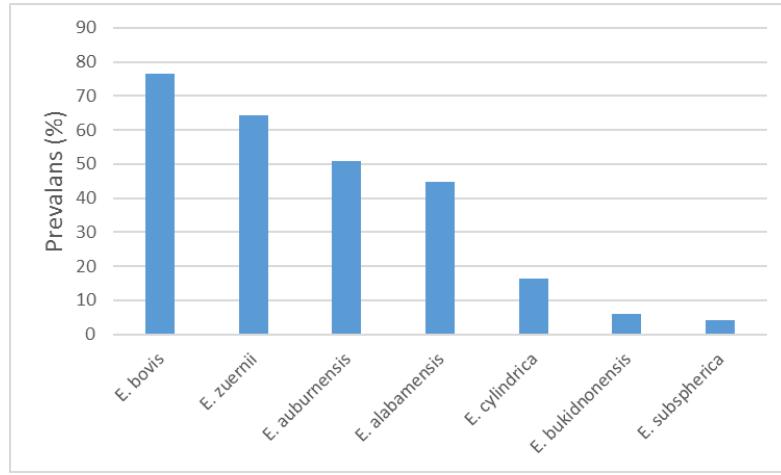
Şekil 4.10 Pozitif örneklerde *Eimeria* ookistleri, 1. A: *E. auburnensis*, B: *E. alabamensis*, C: *E. bukidnonensis*, D: *E. zuernii*



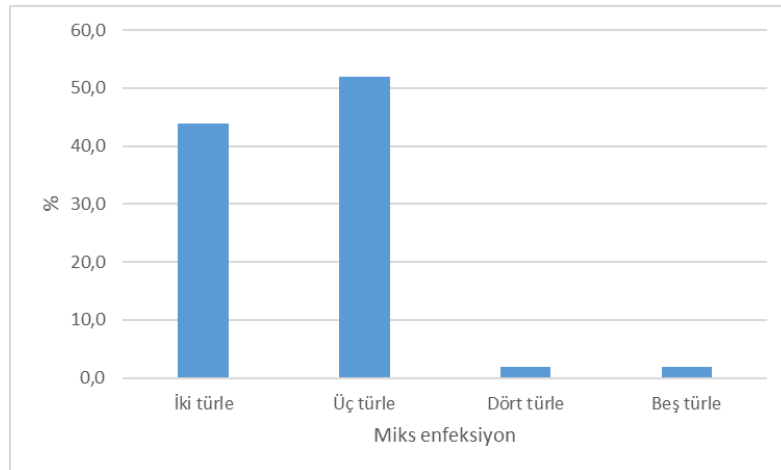
Şekil 4.11 Pozitif örneklerde *Eimeria* ookistleri, 2. A: *E. bovis*, B: *E. subspherica*, C: *E. cylindrica*

**Tablo 4.14** Pozitif örneklerde saptanan *Eimeria* türleri ve prevalansları

| Pozitif Örnek Sayısı | <i>Eimeria</i> türü     | Prevalans |      |
|----------------------|-------------------------|-----------|------|
|                      |                         | Sayı      | %    |
| 98                   | <i>E. bovis</i>         | 75        | 76,5 |
|                      | <i>E. zuernii</i>       | 63        | 64,3 |
|                      | <i>E. auburnensis</i>   | 50        | 51,0 |
|                      | <i>E. alabamensis</i>   | 44        | 44,9 |
|                      | <i>E. cylindrica</i>    | 16        | 16,3 |
|                      | <i>E. bukidnonensis</i> | 6         | 6,1  |
|                      | <i>E. subspherica</i>   | 4         | 4,1  |

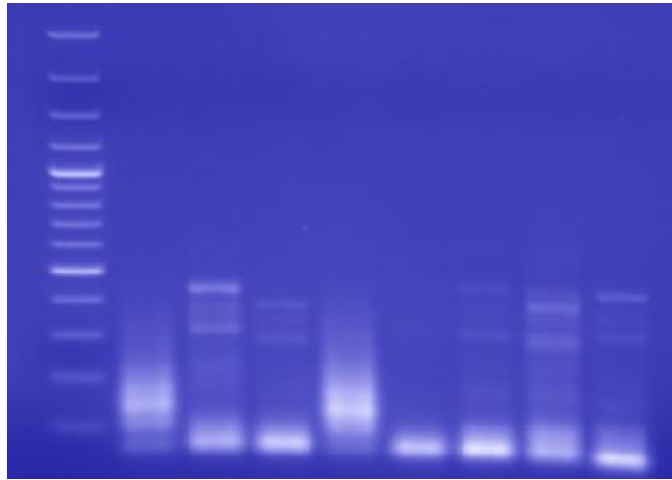
**Şekil 4.12** Pozitif örneklerde *Eimeria* türlerinin dağılım grafiği

*Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen hayvanlarda tek türle enfeksiyon belirlenmemiş olup en yüksek üç türle miks enfeksiyonlar saptanmış bunu sırasıyla iki, dört ve beş türle enfeksiyonlar izlemiştir Şekil 4.13.

**Şekil 4.13** Pozitif örneklerde miks enfeksiyonların dağılım grafiği

#### 4.4 PATOJENİK EIMERIA TÜRLERİ İÇİN RİBOSOMAL ITS-1 GENİNİN AMPLİFİKASYONU

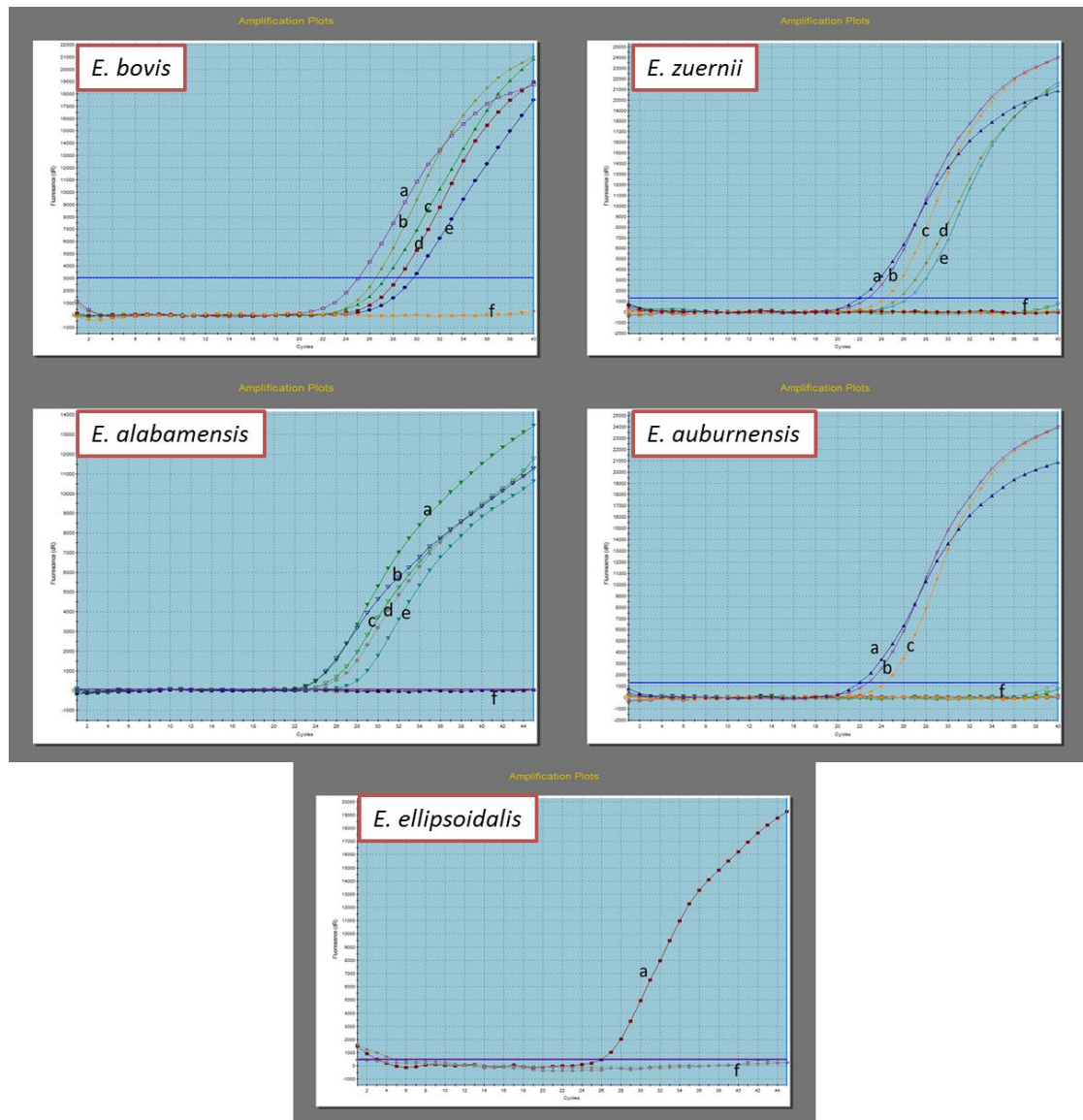
Patojenik *Eimeria* türleri *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. ellipsoidalis* ve *E. zuernii*'nin tür spesifik teşhisi için ITS-1 gen bölgesini spesifik olarak amplifiye eden primer çiftlerinin elde edilmiş ve referans DNA örnekleri ile analizi sonucu bazı non-spesifik amplikonların şekillendiği görülmüş (Şekil 4.14) ve ilgili primerlerin bağlanma spesifiteleri düşük belirlenmiştir.



Şekil 4.14. Patojenik *Eimeria* türleri için ITS-1 gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR analizi sonucu amplikonların agaroz jel üzerinde görünümü

#### 4.5 PATOJEN TÜRLER İÇİN REAL TIME PCR SONUÇLARI

*Eimeria* ookistleri ile pozitif saptanan örneklerle ait genomik DNA izolatlarının patojenik *Eimeria* türleri yönünden TaqMan Real Time PCR sonuçları Tablo 4.15’de verilmiştir. Real Time PCR’da pozitif belirlenen bazı örneklerin patojenik *Eimeria* türlerinin tür bazlı olarak ITS-1 gen bölgesini amplifiye eden spesifik primer ve problarla analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri Şekil 4.15’de gösterilmiştir. Tablo 4.15’de görüleceği üzere incelenen örneklerde patojenik *Eimeria* türleri için DNA kopya sayısı düzeyinde en yüksek pozitiflik *E. bovis* için belirlenmiş bunu sırasıyla *E. zuernii*, *E. auburnensis* ve *E. alabamensis* izlemiştir. Örneklerde *E. ellipsoidalis* pozitifliği belirlenmemiştir.



Şekil 4.15 Patojenik *Eimeria* türleri yönünden pozitif belirlenen bazı örneklerin Real Time PCR’da belirlenen amplifikasyon eğrileri. a: Pozitif kontrol, b-e: Pozitif örnekler, f: Negatif örnekler ve No DNA

Tablo 4.15 *Eimeria* oookistleri ile pozitif saptanan örneklerle ait genomik DNA izolatlarının patojenik *Eimeria* türleri yönünden TaqMan Real Time PCR sonuçları

| İncelenen Genomik DNA İzolat Sayısı | <i>Eimeria</i> türü     | Pozitiflik |          |          |      |
|-------------------------------------|-------------------------|------------|----------|----------|------|
|                                     |                         | Sayı       | Ct (dR)  |          | %    |
|                                     |                         |            | Ortalama | Std Hata |      |
| 98                                  | <i>E. bovis</i>         | 79         | 32,33    | 0,38     | 80,6 |
|                                     | <i>E. zuernii</i>       | 66         | 32,28    | 0,41     | 67,3 |
|                                     | <i>E. auburnensis</i>   | 52         | 33,66    | 0,20     | 53,1 |
|                                     | <i>E. alabamensis</i>   | 46         | 33,31    | 0,32     | 46,9 |
|                                     | <i>E. ellipsoidalis</i> | 0          | 0,0      | 0,0      | 0,0  |

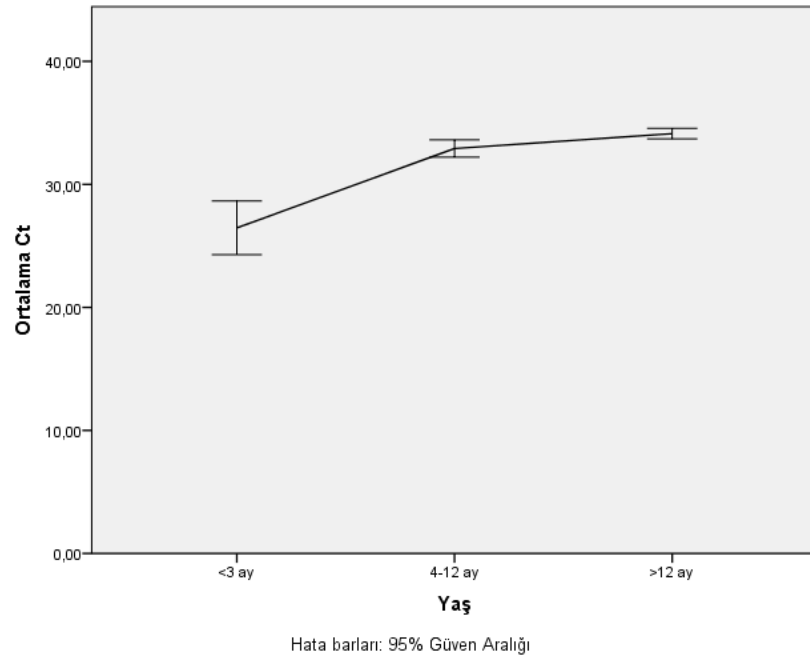
Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. bovis* Ct (dR) değerleri tablo 4.16’da verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik <3 ay yaş grubunda

belirlenmiş bunu sırasıyla 4-12 ay ve >12 ay yaş grupları izlemiştir (Şekil 4.16). Yaş grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde *E. bovis* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Tablo 4.17).

**Tablo 4.16** Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. bovis* Ct (dR) değerleri

|         |            | İstatistik | Bootstrap <sup>a</sup> |                   |         |
|---------|------------|------------|------------------------|-------------------|---------|
|         |            |            | Std. Hata              | 95% Güven Aralığı |         |
|         |            |            |                        | Alt               | Üst     |
| <3 ay   | N          | 13         | 3                      | 7                 | 20      |
|         | Ortalama   | 26,4615    | 1,0072                 | 24,4000           | 28,3973 |
|         | Std. Sapma | 3,60891    | ,63156                 | 1,94682           | 4,53944 |
|         | Std. Hata  | 1,00093    |                        |                   |         |
|         | Minimum    | 20,00      |                        |                   |         |
|         | Maksimum   | 31,20      |                        |                   |         |
| 4-12 ay | N          | 35         | 4                      | 26                | 44      |
|         | Ortalama   | 32,9143    | ,3535                  | 32,1825           | 33,5832 |
|         | Std. Sapma | 2,04179    | ,35233                 | 1,29008           | 2,66451 |
|         | Std. Hata  | ,34513     |                        |                   |         |
|         | Minimum    | 26,50      |                        |                   |         |
|         | Maksimum   | 35,00      |                        |                   |         |
| >12 ay  | N          | 31         | 4                      | 23                | 40      |
|         | Ortalama   | 34,1226    | ,2186                  | 33,6634           | 34,5228 |
|         | Std. Sapma | 1,16038    | ,21809                 | ,64859            | 1,51898 |
|         | Std. Hata  | ,20841     |                        |                   |         |
|         | Minimum    | 30,50      |                        |                   |         |
|         | Maksimum   | 35,50      |                        |                   |         |

<sup>a</sup> Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır



**Şekil 4.16** *E. bovis* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği

**Tablo 4.17** Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. bovis* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

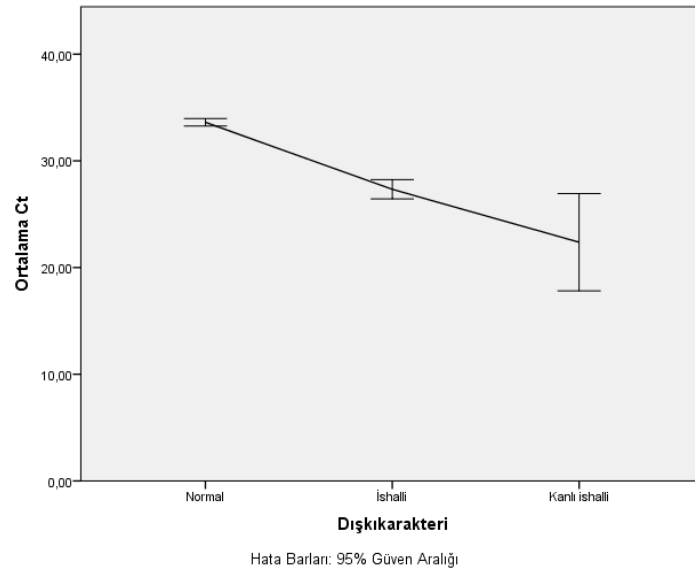
| (I) Yaş | (J) Yaş | Ortalama Farklılık (I-J) | Std. Hata | Sig. | 95% Güven Aralığı |           |
|---------|---------|--------------------------|-----------|------|-------------------|-----------|
|         |         |                          |           |      | Alt sınır         | Üst sınır |
| <3 ay   | 4-12 ay | -6,45275*                | 1,05876   | ,000 | -9,2970           | -3,6085   |
|         | >12 ay  | -7,66104*                | 1,02240   | ,000 | -10,4577          | -4,8643   |
| 4-12 ay | <3 ay   | 6,45275*                 | 1,05876   | ,000 | 3,6085            | 9,2970    |
|         | >12 ay  | -1,20829*                | ,40317    | ,012 | -2,2011           | -,2155    |
| >12 ay  | <3 ay   | 7,66104*                 | 1,02240   | ,000 | 4,8643            | 10,4577   |
|         | 4-12 ay | 1,20829*                 | ,40317    | ,012 | ,2155             | 2,2011    |

\*. Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir.

Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. bovis* Ct (dR) değerleri tablo 4.18’de verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik kanlı ishelli dışkılarda belirlenmiş bunu ishelli ve normal dışkı grupları izlemiştir (Şekil 4.17). Dışkı karakteri grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde kanlı ishelli ve ishelli gruplar ile normal dışkı grubu arasında *E. bovis* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Tablo 4.19).

**Tablo 4.18** Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. bovis* Ct (dR) değerleri

|               |            | İstatistik | Bootstrap <sup>a</sup> |                   |         |
|---------------|------------|------------|------------------------|-------------------|---------|
|               |            |            | Std. Hata              | 95% Güven Aralığı |         |
|               |            |            |                        | Alt               | Üst     |
| Normal        | N          | 66         | 3                      | 59                | 72      |
|               | Ortalama   | 33,6106    | ,1692                  | 33,2808           | 33,9290 |
|               | Std. Sapma | 1,42851    | ,14105                 | 1,14633           | 1,68256 |
|               | Std. Hata  | ,17584     |                        |                   |         |
|               | Minimum    | 29,10      |                        |                   |         |
|               | Maksimum   | 35,50      |                        |                   |         |
| İshalli       | N          | 9          | 3                      | 4                 | 15      |
|               | Ortalama   | 27,3333    | ,3861                  | 26,5116           | 28,1000 |
|               | Std. Sapma | 1,17367    | ,24158                 | ,32057            | 1,40989 |
|               | Std. Hata  | ,39122     |                        |                   |         |
|               | Minimum    | 26,00      |                        |                   |         |
|               | Maksimum   | 29,00      |                        |                   |         |
| Kanlı ishalli | N          | 4          | 2                      | 1                 | 8       |
|               | Ortalama   | 22,3750    | 1,4155                 | 20,0000           | 26,5000 |
|               | Std. Sapma | 2,86865    | 1,15272                | ,00000            | 3,88909 |
|               | Std. Hata  | 1,43433    |                        |                   |         |
|               | Minimum    | 20,00      |                        |                   |         |
|               | Maksimum   | 26,50      |                        |                   |         |

<sup>a</sup> Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır**Şekil 4.17** *E. bovis* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği

**Tablo 4.19** Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. bovis* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

| (I)<br>Dışkı karakteri | (J)<br>Dışkı karakteri | Ortalama Farklılık<br>(I-J) | Std.<br>Hata | Sig. | 95% Güven Aralığı |           |
|------------------------|------------------------|-----------------------------|--------------|------|-------------------|-----------|
|                        |                        |                             |              |      | Alt sınır         | Üst sınır |
| Normal                 | İshalli                | 6,27727*                    | ,42892       | ,000 | 5,0808            | 7,4737    |
|                        | Kanlı ishalleri        | 11,23561*                   | 1,44506      | ,012 | 4,4312            | 18,0400   |
| İshalleri              | Normal                 | -6,27727*                   | ,42892       | ,000 | -7,4737           | -5,0808   |
|                        | Kanlı ishalleri        | 4,95833                     | 1,48672      | ,104 | -1,4757           | 11,3923   |
| Kanlı ishalleri        | Normal                 | -11,23561*                  | 1,44506      | ,012 | -18,0400          | -4,4312   |
|                        | İshalleri              | -4,95833                    | 1,48672      | ,104 | -11,3923          | 1,4757    |

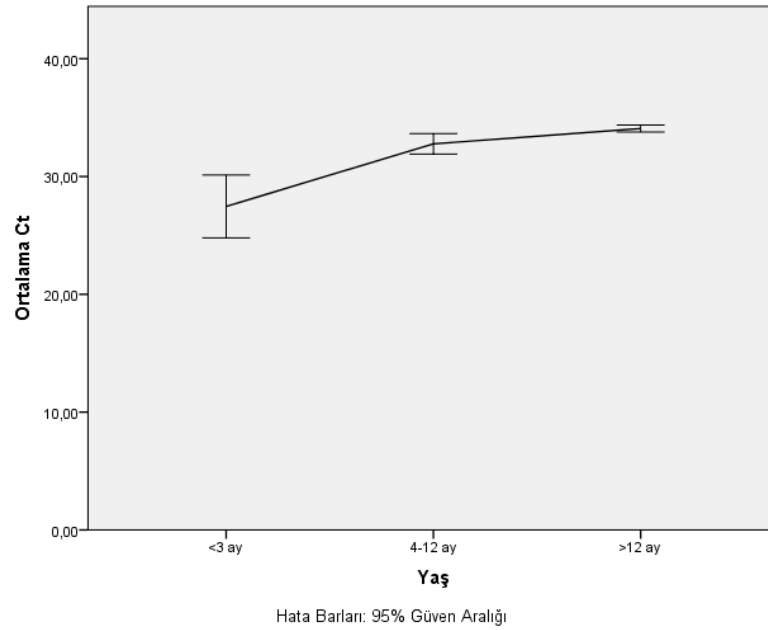
\*. Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir.

Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. zuernii* Ct (dR) değerleri Tablo 4.20’de verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik <3 ay yaş grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla 4-12 ay ve >12 ay yaş grupları izlemiştir (Şekil 4.18). Yaş grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde *E. zuernii* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Tablo 4.21).

**Tablo 4.20** Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. zuernii* Ct (dR) değerleri

|         |            | İstatistik | Bootstrap <sup>a</sup> |                   |         |
|---------|------------|------------|------------------------|-------------------|---------|
|         |            |            | Std. Hata              | 95% Güven Aralığı |         |
|         |            |            |                        | Alt               | Üst     |
| <3 ay   | N          | 12         | 3                      | 6                 | 19      |
|         | Ortalama   | 27,4583    | 1,1852                 | 25,2004           | 29,8499 |
|         | Std. Sapma | 4,19122    | ,70469                 | 2,33415           | 5,22958 |
|         | Std. Hata  | 1,20990    |                        |                   |         |
|         | Minimum    | 22,00      |                        |                   |         |
|         | Maksimum   | 34,00      |                        |                   |         |
| 4-12 ay | N          | 30         | 4                      | 22                | 38      |
|         | Ortalama   | 32,7733    | ,4199                  | 31,8350           | 33,4849 |
|         | Std. Sapma | 2,32645    | ,66477                 | ,99010            | 3,43312 |
|         | Std. Hata  | ,42475     |                        |                   |         |
|         | Minimum    | 23,50      |                        |                   |         |
|         | Maksimum   | 35,50      |                        |                   |         |
| >12 ay  | N          | 24         | 4                      | 17                | 32      |
|         | Ortalama   | 34,0708    | ,1471                  | 33,8000           | 34,3722 |
|         | Std. Sapma | ,69937     | ,07415                 | ,52690            | ,81000  |
|         | Std. Hata  | ,14276     |                        |                   |         |
|         | Minimum    | 33,00      |                        |                   |         |
|         | Maksimum   | 35,00      |                        |                   |         |

<sup>a</sup> Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır.



**Şekil 4.18** *E. zuernii* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği

**Tablo 4.21** Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. zuernii* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

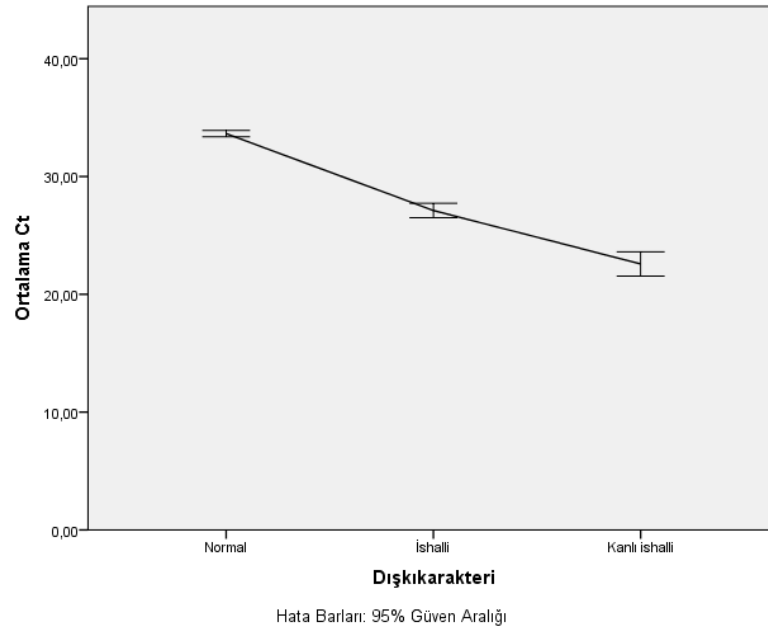
| (I) Yaş                                         | (J) Yaş | Ortalama Farklılık (I-J) | Std. Hata | Sig. | 95% Güven Aralığı |           |
|-------------------------------------------------|---------|--------------------------|-----------|------|-------------------|-----------|
|                                                 |         |                          |           |      | Alt sınır         | Üst sınır |
| <3 ay                                           | 4-12 ay | -5,31500*                | 1,28229   | ,003 | -8,7956           | -1,8344   |
|                                                 | >12 ay  | -6,61250*                | 1,21829   | ,001 | -10,0204          | -3,2046   |
| 4-12 ay                                         | <3 ay   | 5,31500*                 | 1,28229   | ,003 | 1,8344            | 8,7956    |
|                                                 | >12 ay  | -1,29750*                | ,44810    | ,019 | -2,4205           | -,1745    |
| >12 ay                                          | <3 ay   | 6,61250*                 | 1,21829   | ,001 | 3,2046            | 10,0204   |
|                                                 | 4-12 ay | 1,29750*                 | ,44810    | ,019 | ,1745             | 2,4205    |
| *. Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir. |         |                          |           |      |                   |           |

Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. zuernii* Ct (dR) değerleri Tablo 4.22’de verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik kanlı ishelli dışkılarda belirlenmiş bunu ishelli ve normal dışkı grupları izlemiştir (Şekil 4.19). Dışkı karakteri grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde *E. zuernii* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Tablo 4.23).

**Tablo 4.22** Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. zuernii* Ct (dR) değerleri

|                 |            | İstatistik | Bootstrap <sup>a</sup> |                   |         |
|-----------------|------------|------------|------------------------|-------------------|---------|
|                 |            |            | Std. Hata              | 95% Güven Aralığı |         |
|                 |            |            |                        | Alt               | Üst     |
| Normal          | N          | 55         | 3                      | 48                | 61      |
|                 | Ortalama   | 33,6418    | ,1359                  | 33,3709           | 33,9120 |
|                 | Std. Sapma | 1,01173    | ,09538                 | ,81376            | 1,17777 |
|                 | Std. Hata  | ,13642     |                        |                   |         |
|                 | Minimum    | 31,00      |                        |                   |         |
|                 | Maksimum   | 35,50      |                        |                   |         |
| İshalli         | N          | 7          | 3                      | 3                 | 12      |
|                 | Ortalama   | 27,1143    | ,2576                  | 26,6000           | 27,6221 |
|                 | Std. Sapma | ,65936     | ,18428                 | ,19576            | ,90135  |
|                 | Std. Hata  | ,24922     |                        |                   |         |
|                 | Minimum    | 26,00      |                        |                   |         |
|                 | Maksimum   | 28,00      |                        |                   |         |
| Kanlı ishalleri | N          | 4          | 2                      | 1                 | 8       |
|                 | Ortalama   | 22,5750    | ,3203                  | 22,0000           | 23,5000 |
|                 | Std. Sapma | ,65000     | ,26218                 | ,00000            | ,86603  |
|                 | Std. Hata  | ,32500     |                        |                   |         |
|                 | Minimum    | 22,00      |                        |                   |         |
|                 | Maksimum   | 23,50      |                        |                   |         |

<sup>a</sup> Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır.

**Şekil 4.19** *E. zuernii* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği

**Tablo 4.23** Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. zuernii* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

| (I)<br>Dışkı karakteri | (J)<br>Dışkı karakteri | Ortalama Farklılık<br>(I-J) | Std.<br>Hata | Sig. | 95% Güven Aralığı |           |
|------------------------|------------------------|-----------------------------|--------------|------|-------------------|-----------|
|                        |                        |                             |              |      | Alt sınır         | Üst sınır |
| Normal                 | İshalli                | 6,52753*                    | ,28411       | ,000 | 5,7155            | 7,3396    |
|                        | Kanlı ishalli          | 11,06682*                   | ,35247       | ,000 | 9,7055            | 12,4282   |
| İshalli                | Normal                 | -6,52753*                   | ,28411       | ,000 | -7,3396           | -5,7155   |
|                        | Kanlı ishalli          | 4,53929*                    | ,40955       | ,000 | 3,2308            | 5,8477    |
| Kanlı ishalli          | Normal                 | -11,06682*                  | ,35247       | ,000 | -12,4282          | -9,7055   |
|                        | İshalli                | -4,53929*                   | ,40955       | ,000 | -5,8477           | -3,2308   |

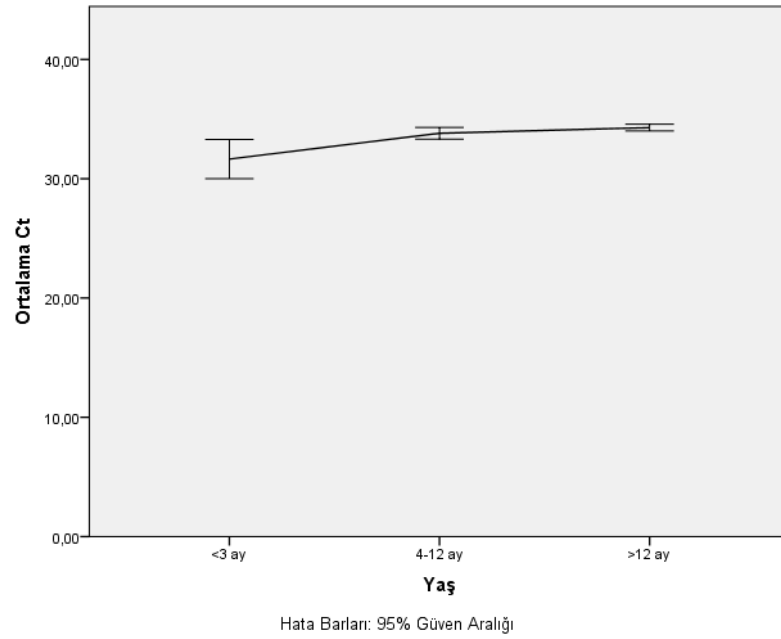
\*. Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir.

Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. auburnensis* Ct (dR) değerleri Tablo 4.24’de verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik <3 ay yaş grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla 4-12 ay ve >12 ay yaş grupları izlemiştir (Şekil 4.20). Yaş grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde <3 ay yaş grubu ile 4-12 ay ve >12 ay yaş grupları arasındaki *E. auburnensis* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Tablo 4.25).

**Tablo 4.24** Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. auburnensis* Ct (dR) değerleri

|         |            | İstatistik | Bootstrap <sup>a</sup> |                   |         |
|---------|------------|------------|------------------------|-------------------|---------|
|         |            |            | Std. Hata              | 95% Güven Aralığı |         |
|         |            |            |                        | Alt               | Üst     |
| <3 ay   | N          | 8          | 3                      | 3                 | 14      |
|         | Ortalama   | 31,6500    | ,6750                  | 30,3500           | 33,0429 |
|         | Std. Sapma | 1,96832    | ,38795                 | ,31403            | 2,25924 |
|         | Std. Hata  | ,69591     |                        |                   |         |
|         | Minimum    | 29,70      |                        |                   |         |
|         | Maksimum   | 34,30      |                        |                   |         |
| 4-12 ay | N          | 24         | 4                      | 17                | 31      |
|         | Ortalama   | 33,8125    | ,2324                  | 33,3770           | 34,2526 |
|         | Std. Sapma | 1,15883    | ,22404                 | ,71774            | 1,55049 |
|         | Std. Hata  | ,23654     |                        |                   |         |
|         | Minimum    | 30,40      |                        |                   |         |
|         | Maksimum   | 35,50      |                        |                   |         |
| >12 ay  | N          | 20         | 4                      | 13                | 28      |
|         | Ortalama   | 34,2850    | ,1308                  | 34,0430           | 34,5618 |
|         | Std. Sapma | ,60112     | ,10180                 | ,31533            | ,75448  |
|         | Std. Hata  | ,13441     |                        |                   |         |
|         | Minimum    | 33,70      |                        |                   |         |
|         | Maksimum   | 35,50      |                        |                   |         |

<sup>a</sup> Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır.



**Şekil 4.20** *E. auburnensis* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği

**Tablo 4.25** Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. auburnensis* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

| (I) Yaş | (J) Yaş | Ortalama Farklılık (I-J) | Std. Hata | Sig. | 95% Güven Aralığı |           |
|---------|---------|--------------------------|-----------|------|-------------------|-----------|
|         |         |                          |           |      | Alt sınır         | Üst sınır |
| <3 ay   | 4-12 ay | -2,16250                 | ,73501    | ,050 | -4,3285           | ,0035     |
|         | >12 ay  | -2,63500*                | ,70877    | ,020 | -4,7984           | -,4716    |
| 4-12 ay | <3 ay   | 2,16250                  | ,73501    | ,050 | -,0035            | 4,3285    |
|         | >12 ay  | -,47250                  | ,27207    | ,249 | -1,1540           | ,2090     |
| >12 ay  | <3 ay   | 2,63500*                 | ,70877    | ,020 | ,4716             | 4,7984    |
|         | 4-12 ay | ,47250                   | ,27207    | ,249 | -,2090            | 1,1540    |

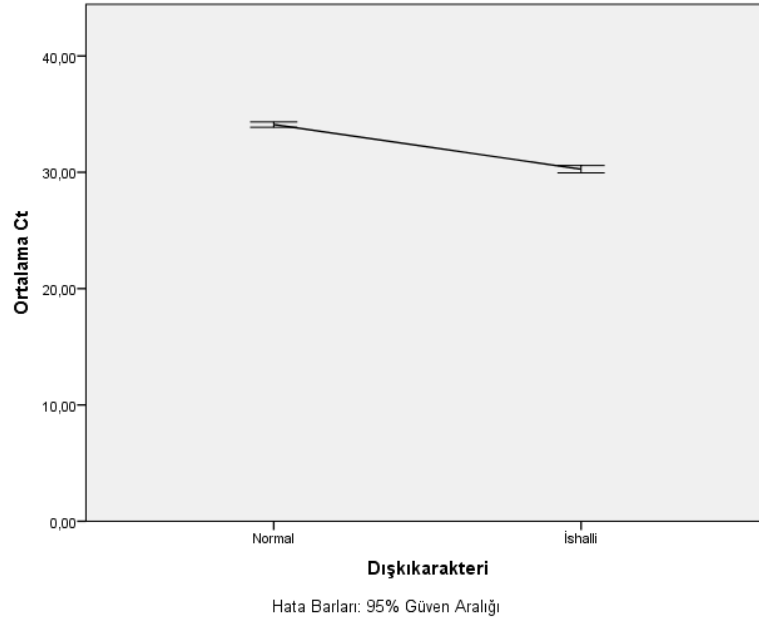
\*, Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir.

Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. auburnensis* Ct (dR) değerleri Tablo 4.26'de verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında ishalleri dışkılarıdaki pozitiflik normal dışkı grubuna göre yüksek belirlenmiştir (Şekil 4.21). Dışkı karakteri grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde *E. auburnensis* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ) (Tablo 4.27).

**Tablo 4.26** Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. auburnensis* Ct (dR) değerleri

| Dışkı karakteri |            | İstatistik | Bootstrap <sup>a</sup> |                   |         |
|-----------------|------------|------------|------------------------|-------------------|---------|
|                 |            |            | Std. Hata              | 95% Güven Aralığı |         |
|                 |            |            |                        | Alt               | Üst     |
| Normal          | N          | 46         |                        |                   |         |
|                 | Ortalama   | 34,1043    | ,1086                  | 33,8870           | 34,3253 |
|                 | Std. Sapma | ,77372     | ,08345                 | ,58833            | ,91559  |
|                 | Std. Hata  | ,11408     |                        |                   |         |
| İshalli         | N          | 6          |                        |                   |         |
|                 | Ortalama   | 30,2667    | ,1153                  | 30,0111           | 30,4625 |
|                 | Std. Sapma | ,30111     | ,11694                 | ,05000            | ,43512  |
|                 | Std. Hata  | ,12293     |                        |                   |         |

<sup>a</sup> Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır.

**Şekil 4.21** *E. auburnensis* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği**Tablo 4.27** Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. auburnensis* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

| t      | df     | Sig.<br>(2-uçlu) | Ortalama<br>Farklılık | Std. Hata<br>Farklılığı | Farklılığın %95<br>Güven Aralığı |         |
|--------|--------|------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------------|---------|
|        |        |                  |                       |                         | Alt                              | Üst     |
| 22,883 | 16,002 | ,000             | 3,83768               | ,16771                  | 3,48216                          | 4,19320 |

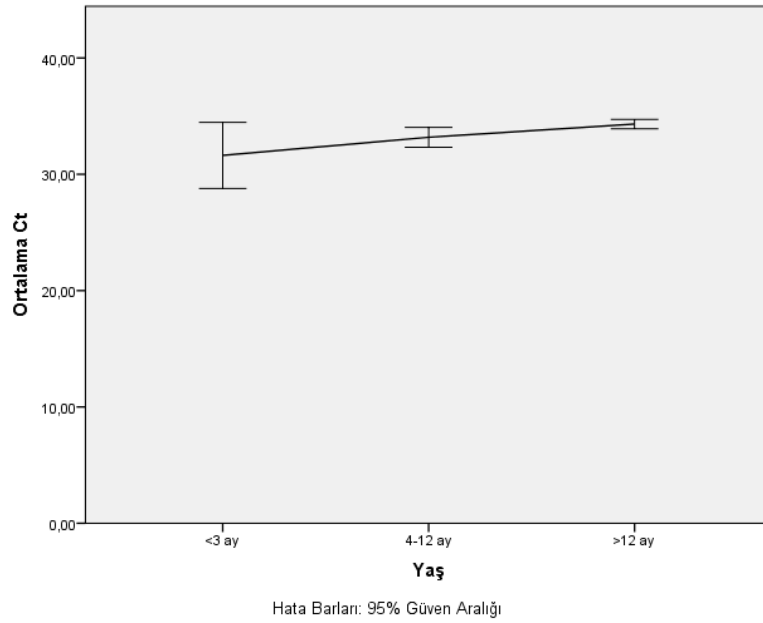
\*, Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir.

Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. alabamensis* Ct (dR) değerleri Tablo 4.28’de verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik <3 ay yaş grubunda belirlenmiş bunu sırasıyla 4-12 ay ve >12 ay yaş grupları izlemiştir (Şekil 4.22). Yaş grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde yaş grupları arasındaki *E. alabamensis* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.29).

**Tablo 4.28** Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. alabamensis* Ct (dR) değerleri

|         |            | İstatistik | Bootstrap <sup>a</sup> |                   |         |
|---------|------------|------------|------------------------|-------------------|---------|
|         |            |            | Std. Hata              | 95% Güven Aralığı |         |
|         |            |            |                        | Alt               | Üst     |
| <3 ay   | N          | 8          | 3                      | 3                 | 13      |
|         | Ortalama   | 31,6250    | 1,1783                 | 29,3333           | 34,0000 |
|         | Std. Sapma | 3,39905    | ,55913                 | ,75829            | 3,78594 |
|         | Std. Hata  | 1,20175    |                        |                   |         |
|         | Minimum    | 28,00      |                        |                   |         |
|         | Maksimum   | 35,50      |                        |                   |         |
| 4-12 ay | N          | 22         | 3                      | 15                | 29      |
|         | Ortalama   | 33,1818    | ,4073                  | 32,2857           | 33,8772 |
|         | Std. Sapma | 1,93283    | ,62367                 | ,66332            | 2,89703 |
|         | Std. Hata  | ,41208     |                        |                   |         |
|         | Minimum    | 26,20      |                        |                   |         |
|         | Maksimum   | 35,00      |                        |                   |         |
| >12 ay  | N          | 16         | 3                      | 10                | 23      |
|         | Ortalama   | 34,3187    | ,1880                  | 33,9390           | 34,6832 |
|         | Std. Sapma | ,75385     | ,11797                 | ,48759            | ,94920  |
|         | Std. Hata  | ,18846     |                        |                   |         |
|         | Minimum    | 33,00      |                        |                   |         |
|         | Maksimum   | 35,50      |                        |                   |         |

<sup>a</sup> Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır.



**Şekil 4.22** *E. alabamensis* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş gruplarına göre dağılım grafiği

**Tablo 4.29** Sığırların yaş gruplarına göre belirlenen *E. alabamensis* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

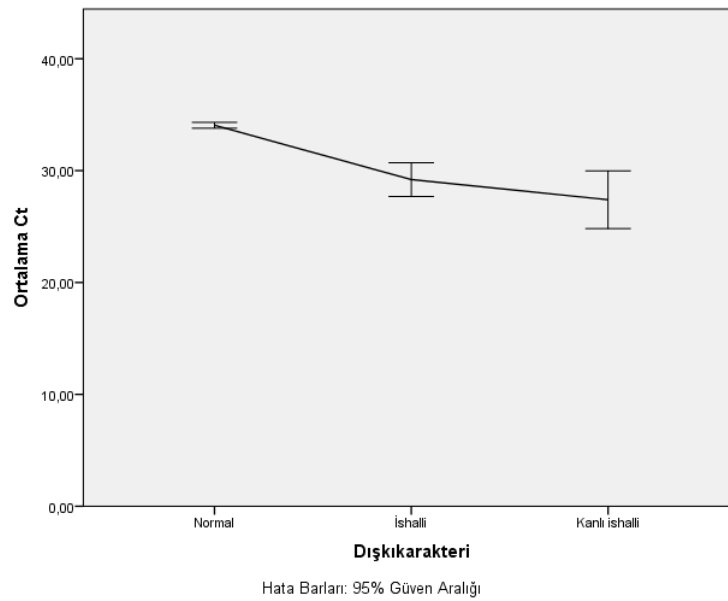
| (I) Yaş | (J) Yaş | Ortalama Farklılık (I-J) | Std. Hata | Sig. | 95% Güven Aralığı |           |
|---------|---------|--------------------------|-----------|------|-------------------|-----------|
|         |         |                          |           |      | Alt sınır         | Üst Sınır |
| <3 ay   | 4-12 ay | -1,55682                 | 1,27044   | ,582 | -5,2980           | 2,1844    |
|         | >12 ay  | -2,69375                 | 1,21644   | ,171 | -6,4316           | 1,0441    |
| 4-12 ay | <3 ay   | 1,55682                  | 1,27044   | ,582 | -2,1844           | 5,2980    |
|         | >12 ay  | -1,13693                 | ,45313    | ,053 | -2,2852           | ,0113     |
| >12 ay  | <3 ay   | 2,69375                  | 1,21644   | ,171 | -1,0441           | 6,4316    |
|         | 4-12 ay | 1,13693                  | ,45313    | ,053 | -,0113            | 2,2852    |

Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. alabamensis* Ct (dR) değerleri Tablo 4.30’da verilmiştir. DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik kanlı ishelli dışkılarda belirlenmiş bunu ishelli ve normal dışkı grupları izlemiştir (Şekil 4.23). Dışkı karakteri grupları arasında DNA kopya sayısı düzeyinde *E. alabamensis* pozitiflikleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Tablo 4.31).

**Tablo 4.30** Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. alabamensis* Ct (dR) değerleri

|               |            | İstatistik | Bootstrap <sup>a</sup> |                   |         |
|---------------|------------|------------|------------------------|-------------------|---------|
|               |            |            | Std. Hata              | 95% Güven Aralığı |         |
|               |            |            |                        | Alt               | Üst     |
| Normal        | N          | 40         | 2                      | 35                | 44      |
|               | Ortalama   | 34,0575    | ,1297                  | 33,8028           | 34,3077 |
|               | Std. Sapma | ,82428     | ,07301                 | ,66711            | ,95220  |
|               | Std. Hata  | ,13033     |                        |                   |         |
|               | Minimum    | 32,60      |                        |                   |         |
|               | Maksimum   | 35,50      |                        |                   |         |
| İshalli       | N          | 3          | 2                      | 1                 | 7       |
|               | Ortalama   | 29,2000    | ,3305                  | 28,5000           | 29,6000 |
|               | Std. Sapma | ,60828     | ,27024                 | ,00000            | ,77782  |
|               | Std. Hata  | ,35119     |                        |                   |         |
|               | Minimum    | 28,50      |                        |                   |         |
|               | Maksimum   | 29,60      |                        |                   |         |
| Kanlı ishalli | N          | 3          | 2                      | 1                 | 7       |
|               | Ortalama   | 27,4000    | ,5544                  | 26,2000           | 28,0000 |
|               | Std. Sapma | 1,03923    | ,49758                 | ,00000            | 1,27279 |
|               | Std. Hata  | ,60000     |                        |                   |         |
|               | Minimum    | 26,20      |                        |                   |         |
|               | Maksimum   | 28,00      |                        |                   |         |

<sup>a</sup> Bootstrap sonuçları 1000 bootstrap örneği bazındadır.



**Şekil 4.23** *E. alabamensis* için ortalama Ct (dR) değerlerinin sığırların dışkı karakterine göre dağılım grafiği

**Tablo 4.31** Sığırların dışkı karakterine göre belirlenen *E. alabamensis* Ct (dR) değerlerinin istatistiksel analizi

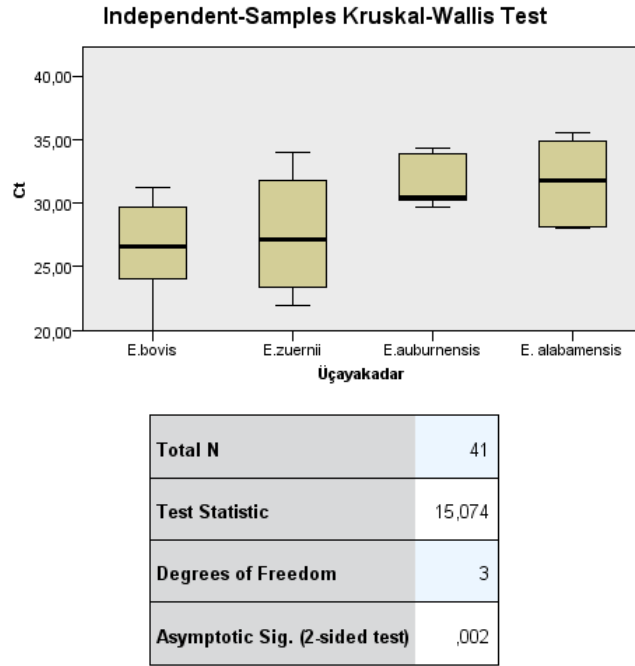
| (I)<br>Dışkı karakteri | (J)<br>Dışkı karakteri | Ortalama Farklılık<br>(I-J) | Std.<br>Hata | Sig. | 95% Güven Aralığı |           |
|------------------------|------------------------|-----------------------------|--------------|------|-------------------|-----------|
|                        |                        |                             |              |      | Alt sınır         | Üst sınır |
| Normal                 | İshalli                | 4,85750*                    | ,37459       | ,006 | 2,7815            | 6,9335    |
|                        | Kanlı ishalli          | 6,65750*                    | ,61399       | ,018 | 2,5474            | 10,7676   |
| İshalli                | Normal                 | -4,85750*                   | ,37459       | ,006 | -6,9335           | -2,7815   |
|                        | Kanlı ishalli          | 1,80000                     | ,69522       | ,209 | -1,3644           | 4,9644    |
| Kanlı ishalli          | Normal                 | -6,65750*                   | ,61399       | ,018 | -10,7676          | -2,5474   |
|                        | İshalli                | -1,80000                    | ,69522       | ,209 | -4,9644           | 1,3644    |

\*. Ortalama farklılık 0,05 düzeyinde önemlidir.

Real Time PCR analizlerinde patojenik *Eimeria* türleri ile pozitif belirlenen <3 ay yaş grubu örneklerde türler için belirlenen ortalama Ct değerleri Tablo 4.32’de verilmiştir. Bu yaş grubu içerisinde DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik *E. bovis* için saptanmış bunu *E. zuernii*, *E. alabamensis* ve *E. auburnensis* türleri izlemiştir. Türler için belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve Kruskal-Wallis testi ile istatistik sonucu Şekil 4.24’de verilmiştir. <3 ay yaş grubu için türler arasındaki istatistiksel farklılıklar Şekil 4.25’de verilmiştir. Şekil 4.24’de görüldüğü üzere *E. bovis* ve *E. zuernii* Ct değerleriyle *E. auburnensis* ve *E. alabamensis* Ct değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemli ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur.

**Tablo 4.32** <3 ay yaş grubu örneklerde patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri

| <3 ay          | Ortalama | N  | Std. Sapma | Std. Hata | Minimum | Maximum |
|----------------|----------|----|------------|-----------|---------|---------|
| E.bovis        | 26,4615  | 13 | 3,60891    | 1,00093   | 20,00   | 31,20   |
| E.zuernii      | 27,4583  | 12 | 4,19122    | 1,20990   | 22,00   | 34,00   |
| E.auburnensis  | 31,6500  | 8  | 1,96832    | ,69591    | 29,70   | 34,30   |
| E. alabamensis | 31,6250  | 8  | 3,39905    | 1,20175   | 28,00   | 35,50   |
| Toplam         | 28,7732  | 41 | 4,12007    | ,64345    | 20,00   | 35,50   |



**Şekil 4.24** Patojenik *Eimeria* türleri için <3 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri

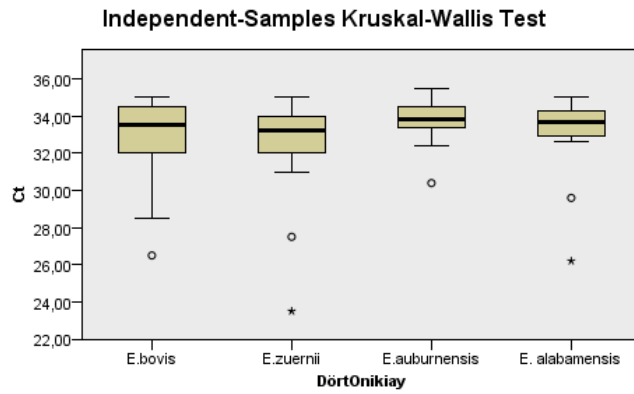
| Sample1-Sample2              | Test Statistic | Std. Error | Std. Test Statistic | Sig. | Adj.Sig. |
|------------------------------|----------------|------------|---------------------|------|----------|
| E.bovis-E.zuernii            | -2,785         | 4,792      | -,581               | ,561 | 1,000    |
| E.bovis-E. alabamensis       | -15,827        | 5,379      | -2,942              | ,003 | ,020     |
| E.bovis-E.auburnensis        | -16,264        | 5,379      | -3,024              | ,002 | ,015     |
| E.zuernii-E. alabamensis     | -13,042        | 5,464      | -2,387              | ,017 | ,102     |
| E.zuernii-E.auburnensis      | -13,479        | 5,464      | -2,467              | ,014 | ,082     |
| E. alabamensis-E.auburnensis | ,438           | 5,985      | ,073                | ,942 | 1,000    |

**Şekil 4.25** Patojenik *Eimeria* türleri için <3 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin türler arasındaki istatistiksel farklılıkları

Real Time PCR analizlerinde patojenik *Eimeria* türleri ile pozitif belirlenen 4-12 ay yaş grubu örneklerde türler için belirlenen ortalama Ct değerleri Tablo 4.33’de verilmiştir. Bu yaş grubunda türler için belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve Kruskal-Wallis testi ile istatistik sonucu Şekil 4.26’de verilmiştir. Şekil 4.26’de görüldüğü üzere bu yaş grubunda *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. auburnensis* ve *E. alabamensis* Ct değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemsiz ( $p>0,05$ ) bulunmuştur.

**Tablo 4.33** 4-12 ay yaş grubu örneklerde patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri

| 4-12 ay               | Ortalama | N   | Std. Sapma | Std. Hata | Minimum | Maximum |
|-----------------------|----------|-----|------------|-----------|---------|---------|
| <i>E.bovis</i>        | 32,8824  | 34  | 2,06361    | ,35391    | 26,50   | 35,00   |
| <i>E.zuernii</i>      | 32,6214  | 28  | 2,32974    | ,44028    | 23,50   | 35,00   |
| <i>E.auburnensis</i>  | 33,8125  | 24  | 1,15883    | ,23654    | 30,40   | 35,50   |
| <i>E. alabamensis</i> | 33,1818  | 22  | 1,93283    | ,41208    | 26,20   | 35,00   |
| Toplam                | 33,0824  | 108 | 1,97351    | ,18990    | 23,50   | 35,50   |



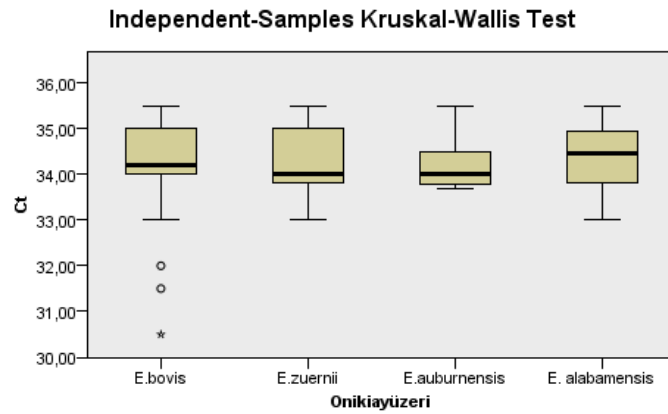
|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| <b>Total N</b>                        | 108   |
| <b>Test Statistic</b>                 | 5,400 |
| <b>Degrees of Freedom</b>             | 3     |
| <b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b> | ,145  |

**Şekil 4.26** Patojenik *Eimeria* türleri için 4-12 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri

Real Time PCR analizlerinde patojenik *Eimeria* türleri ile pozitif belirlenen >12 ay yaş grubu örneklerde türler için belirlenen ortalama Ct değerleri Tablo 4.34’de verilmiştir. Bu yaş grubunda türler için belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve Kruskal-Wallis testi ile istatistik sonucu Şekil 4.27’de verilmiştir. Şekil 4.27’de görüldüğü üzere bu yaş gurubunda patojenik *Eimeria* türlerinin Ct değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemsiz ( $p>0,05$ ) bulunmuştur.

**Tablo 4.34** >12 ay yaş grubu örneklerde patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri

| >12 ay                | Ortalama | N  | Std. Sapma | Std. Hata | Minimum | Maximum |
|-----------------------|----------|----|------------|-----------|---------|---------|
| <i>E.bovis</i>        | 34,1226  | 31 | 1,16038    | ,20841    | 30,50   | 35,50   |
| <i>E.zuernii</i>      | 34,0708  | 24 | ,69937     | ,14276    | 33,00   | 35,00   |
| <i>E.auburnensis</i>  | 34,2850  | 20 | ,60112     | ,13441    | 33,70   | 35,50   |
| <i>E. alabamensis</i> | 34,3188  | 16 | ,75385     | ,18846    | 33,00   | 35,50   |
| Toplam                | 34,1791  | 91 | ,86891     | ,09109    | 30,50   | 35,50   |



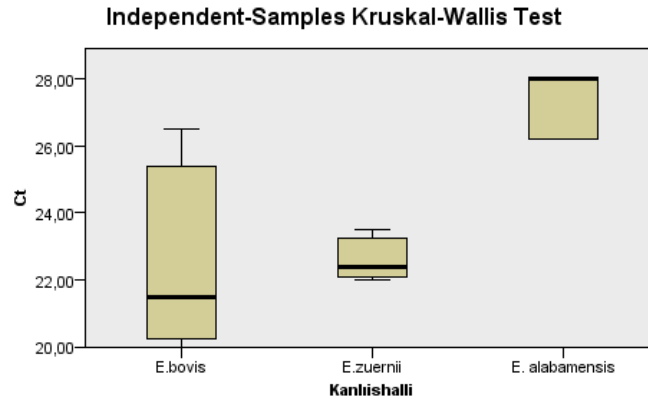
|                                |      |
|--------------------------------|------|
| Total N                        | 94   |
| Test Statistic                 | ,622 |
| Degrees of Freedom             | 3    |
| Asymptotic Sig. (2-sided test) | ,891 |

**Şekil 4.27** Patojenik *Eimeria* türleri için >12 ay yaş grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri

Real Time PCR analizlerinde patojenik *Eimeria* türleri ile pozitif belirlenen dışkı karakterine göre kanlı ishelli gruptaki örneklerde türler için belirlenen ortalama Ct değerleri Tablo 4.35’de verilmiştir. Bu grup içerisinde DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik *E. bovis* için saptanmış bunu *E. zuernii* ve *E. alabamensis* türleri izlemiştir. Türler için belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve Kruskal-Wallis testi ile istatistik sonucu Şekil 4.28’de verilmiştir. Şekil 4.28’de görüldüğü üzere kanlı ishelli gurubunda patojenik *Eimeria* türlerinin Ct değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemsiz ( $p>0,05$ ) bulunmuştur.

**Tablo 4.35** Kanlı ishali dışkı grubu örneklerde patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri

| Kanlıishalli          | Ortalama | N  | Std. Sapma | Minimum | Maksimum | Std. Hata |
|-----------------------|----------|----|------------|---------|----------|-----------|
| <i>E.bovis</i>        | 22,3750  | 4  | 2,86865    | 20,00   | 26,50    | 1,43433   |
| <i>E.zuernii</i>      | 22,5750  | 4  | ,65000     | 22,00   | 23,50    | ,32500    |
| <i>E. alabamensis</i> | 27,4000  | 3  | 1,03923    | 26,20   | 28,00    | ,60000    |
| Toplam                | 23,8182  | 11 | 2,84809    | 20,00   | 28,00    | ,85873    |



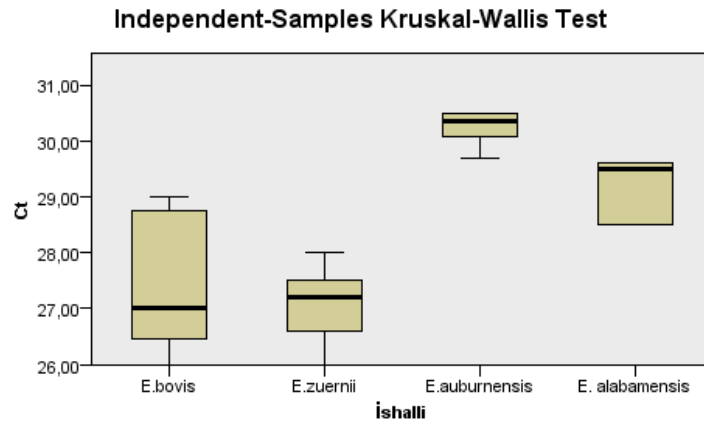
|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| <b>Total N</b>                        | 11    |
| <b>Test Statistic</b>                 | 5,501 |
| <b>Degrees of Freedom</b>             | 2     |
| <b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b> | ,064  |

**Şekil 4.28** Patojenik *Eimeria* türleri için kanlı ishali dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri

Dışkı karakterine göre ishali gruptaki örneklerde patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri Tablo 4.36’de verilmiştir. Bu grup içerisinde DNA kopya sayısı bazında en yüksek pozitiflik *E. bovis* için saptanmış bunu *E. zuernii*, *E. alabamensis* ve *E. auburnensis* türleri izlemiştir. Türler için belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve Kruskal-Wallis testi ile istatistik sonucu Şekil 4.29’da verilmiştir. Şekil 4.30’da görüldüğü üzere üzere *E. bovis* ve *E. zuernii* Ct değerleriyle *E. auburnensis* Ct değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemli ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur.

**Tablo 4.36** İshalli dışkı grubu örneklerinde patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri

| İshalli               | Ortalama | N  | Std. Sapma | Minimum | Maksimum | Std. Hata |
|-----------------------|----------|----|------------|---------|----------|-----------|
| <i>E.bovis</i>        | 27,3333  | 9  | 1,17367    | 26,00   | 29,00    | ,39122    |
| <i>E.zuernii</i>      | 27,1143  | 7  | ,65936     | 26,00   | 28,00    | ,24922    |
| <i>E.auburnensis</i>  | 30,2667  | 6  | ,30111     | 29,70   | 30,50    | ,12293    |
| <i>E. alabamensis</i> | 29,2000  | 3  | ,60828     | 28,50   | 29,60    | ,35119    |
| Toplam                | 28,2000  | 25 | 1,56072    | 26,00   | 30,50    | ,31214    |



|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| <b>Total N</b>                        | 25     |
| <b>Test Statistic</b>                 | 16,596 |
| <b>Degrees of Freedom</b>             | 3      |
| <b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b> | ,001   |

**Şekil 4.29** Patojenik *Eimeria* türleri için ishalli dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri

| Sample1-Sample2                              | Test Statistic | Std. Error | Std. Test Statistic | Sig. | Adj.Sig. |
|----------------------------------------------|----------------|------------|---------------------|------|----------|
| <i>E.bovis</i> - <i>E.zuernii</i>            | -,103          | 3,702      | -,028               | ,978 | 1,000    |
| <i>E.bovis</i> - <i>E. alabamensis</i>       | -8,556         | 4,897      | -1,747              | ,081 | ,484     |
| <i>E.bovis</i> - <i>E.auburnensis</i>        | -13,889        | 3,871      | -3,587              | ,000 | ,002     |
| <i>E.zuernii</i> - <i>E. alabamensis</i>     | -8,452         | 5,069      | -1,667              | ,095 | ,573     |
| <i>E.zuernii</i> - <i>E.auburnensis</i>      | -13,786        | 4,087      | -3,373              | ,001 | ,004     |
| <i>E. alabamensis</i> - <i>E.auburnensis</i> | 5,333          | 5,194      | 1,027               | ,305 | 1,000    |

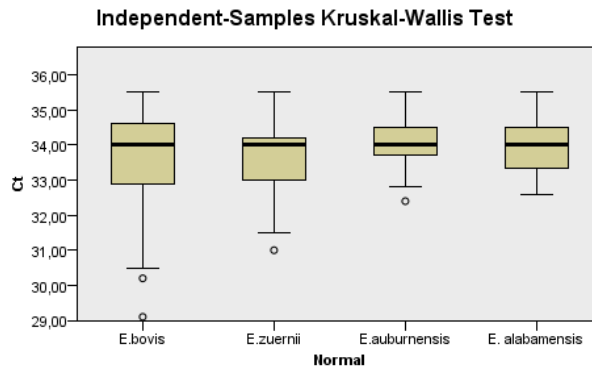
**Şekil 4.30** Patojenik *Eimeria* türleri için ishalli dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin türler arasındaki istatistiksel farklılıkları

Dışkı karakterine göre normal dışkı gurubundaki örneklerde türler için belirlenen ortalama Ct değerleri Tablo 4.37’de verilmiştir. Türler için belirlenen Ct değerlerinin

dağılım grafiği ve Kruskal-Wallis testi ile istatistik sonucu Şekil 4.31’de gösterilmiştir. Şekil 4.31’de görüldüğü üzere normal dışkı grubunda patojenik *Eimeria* türlerinin Ct değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemsiz ( $p>0,05$ ) bulunmuştur.

**Tablo 4.37** Normal dışkı grubu örneklerinde patojenik *Eimeria* türleri için belirlenen ortalama Ct değerleri

| Normal dışkı          | Ortalama | N   | Std. Sapma | Minimum | Maksimum | Std. Hata |
|-----------------------|----------|-----|------------|---------|----------|-----------|
| <i>E.bovis</i>        | 33,6106  | 66  | 1,42851    | 29,10   | 35,50    | ,17584    |
| <i>E.zuernii</i>      | 33,6418  | 55  | 1,01173    | 31,00   | 35,50    | ,13642    |
| <i>E.auburnensis</i>  | 34,1043  | 46  | ,77372     | 32,40   | 35,50    | ,11408    |
| <i>E. alabamensis</i> | 34,0575  | 40  | ,82428     | 32,60   | 35,50    | ,13033    |
| Toplam                | 33,8150  | 207 | 1,10595    | 29,10   | 35,50    | ,07687    |

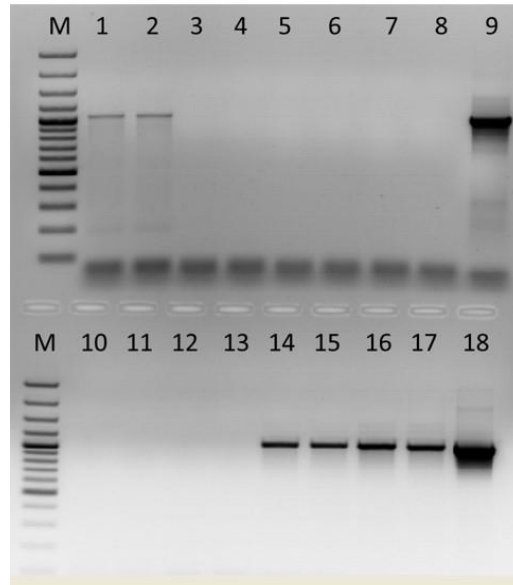


|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| Total N                        | 207   |
| Test Statistic                 | 4,371 |
| Degrees of Freedom             | 3     |
| Asymptotic Sig. (2-sided test) | ,224  |

**Şekil 4.31** Patojenik *Eimeria* türleri için normal dışkı grubunda belirlenen Ct değerlerinin dağılım grafiği ve istatistiksel analizleri

#### 4.6 18S rRNA GEN BÖLGESİNİN AMPLİFİKASYON VE SEKANS ANALİZİ SONUÇLARI

Morfolojik identifikasyon ve Real Time PCR sonuçları temelinde çeşitli *Eimeria* türleri ile enfekte bulunan örneklerle ait genomik DNA izolatlarının 18S rRNA gen bölgesinin dizayn edilen primerlerle amplifikasyonu sonucu hedef büyüklükte ampliconların şekillendiği görülmüştür (Şekil 4.32).



**Şekil 4.32** Bazı *Eimeria* pozitif örneklerle ait izolatların parsiyel 18S subunit (SSU) rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); 1,2,14-17: Pozitif örnekler; 9: *E. zuernii* pozitif kontrol (Japonya); 18: *E. bovis* pozitif kontrol (Japonya); 3-8,10-13: Negatif örnekler

Uygun DNA yoğunluğunda ve konsantrasyonunda belirlenen mikis enfekte örneklerle ait toplam 5 genomik DNA izolatı (Tablo 4.38) klonlama prosedürlerine tabii tutulmuş ve agar üzerinde belirlenen kolonilerden farklı *Eimeria* türlerine ait insertlerin yakalanabileceği göz önüne alınarak her izolat için üç ayrı koloni seçilmiş ve plazmid pürifikasyonları yapılmıştır.

**Tablo 4.38** Klonlama ve plazmid pürifikasyonuna tabii tutulan genomik DNA izolatları

| Genomik DNA İzolatı | Morfolojik İdentifikasyon                                         | Real Time PCR                                                     |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| İzolat 1            | <i>E. zuernii</i> , <i>E. bovis</i> ,<br><i>E. bukidnonensis</i>  | <i>E. zuernii</i> , <i>E. bovis</i>                               |
| İzolat 2            | <i>E. bovis</i> , <i>E. alabamensis</i> , <i>E. subspherica</i>   | <i>E. bovis</i> , <i>E. alabamensis</i>                           |
| İzolat 3            | <i>E. zuernii</i> , <i>E. auburnensis</i> , <i>E. alabamensis</i> | <i>E. zuernii</i> , <i>E. auburnensis</i> , <i>E. alabamensis</i> |
| İzolat 4            | <i>E. bovis</i> , <i>E. cylindrica</i> , <i>E. zuernii</i>        | <i>E. bovis</i> , <i>E. zuernii</i>                               |
| İzolat 5            | <i>E. auburnensis</i> , <i>E. cylindrica</i> , <i>E. zuernii</i>  | <i>E. auburnensis</i> , <i>E. zuernii</i>                         |

Elde edilen toplam 15 plazmid DNA izolatının vektör spesifik pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekans analizi sonucu Blastn algoritması kullanılarak belirlenen türler GenBank aksesyon numaraları ile birlikte Tablo 4.39’da nükleotid sekansları ise Şekil 4.33’de verilmiştir.

**Tablo 4.39** Sekanslanan *Eimeria* izolatlarının tür, incelenen gen bölgesi ve GenBank aksesyon numaraları

| İzolat   | Ait olduğu genomik DNA izolatı | Tür                     | Gen Bölgesi | GenBank Aksesyon |
|----------|--------------------------------|-------------------------|-------------|------------------|
| ERU-Ez1  | İzolat 1                       | <i>E. zuernii</i>       | 18S rRNA    | KU052223         |
| ERU-Ez2  | İzolat 3                       | <i>E. zuernii</i>       | 18S rRNA    | KU052224         |
| ERU-Ez3  | İzolat 4                       | <i>E. zuernii</i>       | 18S rRNA    | KU052225         |
| ERU-Ez4  | İzolat 5                       | <i>E. zuernii</i>       | 18S rRNA    | KU052226         |
| ERU-Eb1  | İzolat 1                       | <i>E. bovis</i>         | 18S rRNA    | KU052227         |
| ERU-Eb2  | İzolat 1                       | <i>E. bovis</i>         | 18S rRNA    | KU052228         |
| ERU-Eb3  | İzolat 2                       | <i>E. bovis</i>         | 18S rRNA    | KU052229         |
| ERU-Eb4  | İzolat 4                       | <i>E. bovis</i>         | 18S rRNA    | KU052230         |
| ERU-Eau1 | İzolat 3                       | <i>E. auburnensis</i>   | 18S rRNA    | KU052231         |
| ERU-Eau2 | İzolat 5                       | <i>E. auburnensis</i>   | 18S rRNA    | KU052232         |
| ERU-Eal1 | İzolat 2                       | <i>E. alabamensis</i>   | 18S rRNA    | KU052233         |
| ERU-Eal2 | İzolat 2                       | <i>E. alabamensis</i>   | 18S rRNA    | KU052234         |
| ERU-Eal3 | İzolat 3                       | <i>E. alabamensis</i>   | 18S rRNA    | KU052235         |
| ERU-Ecy1 | İzolat 4                       | <i>E. cylindrica</i>    | 18S rRNA    | KU052236         |
| ERU-Ebu1 | İzolat 1                       | <i>E. bukidnonensis</i> | 18S rRNA    | KU052237         |

**Şekil 4.33** Araştırma yöresinde sığırlarda karakterize edilen *Eimeria* izolatlarının nükleotid sekansları

#### 4.7 18S rRNA GEN BÖLGESİNİN FİLOGENETİK ANALİZ SONUÇLARI

Araştırma yöresinde sığırlarda belirlenen ve sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılan *Eimeria* izolatları ile sığırlardan yalnızca Japonya'dan kaydedilmiş olan *Eimeria* izolatlarının 18S rRNA gen bölgesine göre ikili hizalama sonuçları Tablo 4.40'da verilmiştir. İlgili izolatlara ait nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları ise Şekil 4.34'de gösterilmiştir. Şekil 4.34'de görüldüğü üzere araştırma sahasından izole edilen izolatlar ile Japonya *Eimeria* izolatları arasında interspesifik ve intraspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. İncelenen *Eimeria* izolatları arasında ortalama genetik heterojenite  $2,8 \pm 0,3$  belirlenmiştir. İnterspesifik nükleotid varyasyonlarının yoğun olarak 220-300. ve 640-750. nükleotidler arasında yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 4.34). Saptanan izolatların birbirleri ve Japonya izolatlarıyla hizalama analizleri sonucu oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 4.35'de verilmiştir. Filogenetik ağaç üzerinde görüleceği üzere araştırma izolatlarının tür bazlı olarak Japonya izolatlarıyla birlikte kümeler oluşturmuşlardır. Araştırma yöresinde belirlenen *E. bovis* ERU-Eb1-Eb4 izolatları  $0,4 \pm 0,1$  genetik farklılık gösterirken Japonya *E. bovis* izolatlarıyla ortalama  $0,2 \pm 0,1$  farklılık göstermiştir. *E. zuernii* ERU-Ez1-Ez4 izolatları kendi aralarında ortalama  $0,3 \pm 0,1$ , Japonya izolatlarıyla ise ortalama  $0,2 \pm 0,1$  farklılık göstermiştir. *E. alabamensis* ERU-Eal1-Eal3 izolatları kendi aralarında ortalama  $0,7 \pm 0,2$ , Japonya izolatlarıyla ise ortalama  $0,1 \pm 0,1$  farklı bulunmuştur. *E. auburnensis* ERU-Eau1-Eau2 izolatları kendi aralarında  $0,2 \pm 0,1$ , Japonya izolatlarıyla ise ortalama  $0,1 \pm 0,1$  farklılık göstermiştir. *E. bukidnonensis* ERU-Ebu1 izolat Japonya izolatlarıyla  $0,4 \pm 0,2$  farklılık göstermiş, *E. cylindrica* ERU-Ecy1 izolatı ise Japonya izolatlarıyla %100,0 identik bulunmuştur.















## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*Eimeria* soyundaki Coccidian parazitler dünya çapında sığırların gastro-intestinal parazitleri arasında önemli bir rol oynamaktadır (60). Tek hücreli bu parazitler özellikle genç hayvanlarda problemlere yol açmaktadır. Ancak ergin bireylerde de enfeksiyona yol açabilen parazitler bu hayvanlarda da bazen patolojiye sebebiyet verebilirler (1). Eimeriosis için kanlı ishal tablosu tipik olarak bilinmekle birlikte sığır coccidiosis'inin sıklıkla sulu ishal tablosuyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (7, 16). Bununla birlikte coccidiosis sıklıkla immun sistemin baskılanmasına yol açmakta olup bu durum da özellikle buzağuları diğer hastalıkla daha duyarlı hale getirmektedir (38). Sığır coccidiosis'i ayrıca sığır yetiştiriciliğinde oldukça yüksek ekonomik kayıplara yol açmakta olup Amerika Birleşik Devletlerinde hastalığa bağlı yıllık kayıpların 346 milyon ile 1.36 milyar dolar arasında değiştiği kaydedilmiştir (61). Sığırlarda bugüne kadar coccidiosis etkeni olarak biri Isospora soyunda olmak üzere 21 tür bildirilmiş olup bu türlerden 13'ünün Avrupa'daki sığırlarda görüldüğü kaydedilmiştir (38, 39). Bu türlerin çoğunun düşük patojeniteye sahip olduğu bilinmekte olup, bunlar arasında yalnızca *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. ellipsoidalis* ve *E. zuernii* türlerinin patojenik olduğu ve buzağılarda ağır klinik tabloya yol açtığı kaydedilmiştir (1). Patojen bu türler arasında özellikle *E. bovis* ve *E. zuernii* oldukça yüksek patojeniteye sahip olup buzağılarda genellikle şiddetli kanlı ishale sebep olmaktadır (62, 63).

Bu çalışmada Kayseri'nin Mahzemin ilçesindeki sığırlarda coccidiosis'e yol açan patojenik *Eimeria* türlerinin konvansiyonel morfolojik ve moleküler tabanlı teknikler ile araştırılması ve hastalıktan sorumlu türlerin moleküler epidemiyolojisinin ortaya konması hedeflenmiştir. Nitekim Türkiye'de sığır coccidiosis'i ile ilgili günümüze kadar yapılan çalışmalar sınırlıdır. Aynı zamanda bu çalışmaların konvansiyonel parazitolojik teşhis yöntemleri ve morfolojik identifikasyona göre prevalans çalışmaları şeklinde olduğu görülmektedir. Sığır coccidiosis'i üzerine yapılan bu çalışmalarda enfeksiyon oranları Ankara ve çevresinde %16,0 (31); Ankara, Kayseri, Konya, Çorum, Yozgat, Amasya,

Eskişehir, Samsun, Erzurum, Erzincan, Malatya, Adana, Bolu, Adapazarı ve Afyon'dan örneklenmiş sığırlarda %93,33 (32); Elazığ'da %51,4 (25), Kars'ta %90,8 (19), Trakya bölgesinde %68,1 (21); Bursa'da %49,3 (29), Van'da %22,53-%86,4 (24, 27, 28); Hakkari'de %89,13 (26), Afyon'da %20,04 (22), Erzurum'da %25,9 (23) ve Kırşehir'de %50,6 (30) olarak rapor edilmiştir. Ayrıca Arslan ve ark. (15), Kars yöresinde *Eimeria* ookistlerinin yaygınlığını periparturient dönemdeki ineklerde %65,6 periparturient dönem dışındaki gebe ineklerde ise %60,0 olarak kaydetmişlerdir. Çalışmamızda Kayseri'nin Mahzemin yöresindeki sığırlarda parazitolojik inceleme sonuçlarına göre sığır coccidiosis'inin yaygınlığı %65,3 olarak saptanmış olup bu oranın yukarıda Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden bildirilen yayılış sınırları içerisinde olduğu dikkati çekmiştir. Bu çalışmada ayrıca sığırların yaş grupları, cinsiyeti, ırkı ve dışkı karakterlerine göre *Eimeria* pozitifliğinde istatistiksel bir farklılık belirlenmemiş olup tüm gruplarda ookistlerin varlığı dikkati çekmiştir. Benzer sonuçlar Heidari ve ark. (64) tarafından da rapor edilmiştir. Buna karşın bazı araştırmacılar (30, 33, 65) yaşa bağlı coccidiosis görülme oranında farklılıklar bildirmişler ve genelde 6-12 ay yaş grubu sığırlarda coccidiosis görülme oranını yüksek bulmuşlardır.

Çalışmamızda *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen 98 sığırdaki ortalama OPG değeri 883,8 (min:50,00, max:5666,10) belirlenmiş olup ookist düzeylerinin nadir olarak 5000 OPG'yi geçtiği görülmüştür. Danimarka ve Estonya'da sığırlarda doğal enfeksiyonlar üzerine yapılan diğer bazı çalışmalarda (14, 66, 67) da benzer sonuçlar bildirilirken Polonya, Almanya ve Güney Afrika'da sığırlar üzerinde yürütülmüş diğer bazı çalışmalarda ise (68-70) daha yüksek oranlar rapor edilmiştir. Çalışmada OPG değerlerinin sığırların yaşına bağlı olarak yükseldiği belirlenmiş olup <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları ile >12 ay yaş grubu arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli ( $p<0,05$ ) bulunmuş, <3 ay ve 4-12 ay yaş grupları arasındaki farklılık ise önemsiz ( $p>0,05$ ) belirlenmiştir. Bu sonuçlar Koutny ve ark. (71)'nin bulgularıyla paralellik göstermiş olup özellikle buzağı ve genç sığırların gelişen hastalık için risk altında olduğunu ortaya çıkarmıştır. Özellikle 4-12 ay yaş grubundaki sığırların yüksek düzeyde *Eimeria* ookistleri çıkarmasının, Taylor ve Catchpole (7) tarafından da belirtildiği gibi gelişmemiş immun sistemden ziyade muhtemelen immun sistemin baskınmasıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür. Bunun yanında çalışmamızda sığırların dışkı karakterlerine göre ortalama OPG değeri en yüksek kanlı ishalleri dışkılarıda belirlenmiş bunu ishalleri ve normal dışkı

örnekleri izlemiştir. OPG değerlerinin dışkı karakterlerine göre dağılımında her üç kategori için de istatistiksel farklılık önemli ( $p>0,05$ ) bulunmuştur. Bu sonuç da özellikle 3 aylığa kadar buzağılar başta olmak üzere bir yaşına kadar genç sığırlarda görülen ishal olgularında coccidiosis'in de önemli rol üstlendiğini göstermektedir. Benzer şekilde Koutny ve ark. (71), şekilli dışkıları ile yarı sulu ve sulu dışkıları *Eimeria* oocistlerinin istatistiksel anlamda daha yüksek olduğunu kaydetmişlerdir. Yine Bangoura ve ark. (62), *E. zuernii* ile deneysel enfekte buzağılarda kantitatif düzeyde oocysts çıkarımı ve dışkı karakteri arasında pozitif korelasyon saptamışlar ve enfeksiyon yükünün klinik semptomların ortaya çıkması üzerine belirgin etkisi olduğunu kaydetmişlerdir. Buna karşın bazı araştırmacılar (1, 71) ise oocyst çıkarım dozunun klinik coccidiosis'in ağır seyretmesiyle çok yakın ilişkili olmadığını belirtmişlerdir. Bunun yanında sığır coccidiosis'i üzerine birçok epidemiyolojik çalışmada (5, 22, 69) klinik olguların nadiren veya bildirilmemiş olduğu dikkati çekmektedir. Bu şekilde sığırlarda coccidiosis'in daha çok subklinik formda görüldüğü genel kabul görmektedir. Nitekim çalışmamızda da coccidiosis yönünden pozitif belirlenen 98 sığırdan yalnızca 4'ü kanlı ishalleri olmak üzere toplam 14 (%14,3) hayvanda ishal tablosunun belirlenmiş olması da bu genel kanaati destekler niteliktedir. Bunun yanında mevcut çalışmada sığırların cinsiyet ve ırkına bağlı olarak ortalama OPG değerlerinde istatistiksel bir önem olmadığı belirlenmiştir.

*Eimeria* türlerinin prevalansı, coğrafik bölge (72), iklim (73), hayvanların yaşı ve barınma durumları (1) gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Sığırlarda coccidiosis'e yol açan türlerden şimdiye kadar 12'sinin morfolojik identifikasyon sonuçlarına göre Türkiye'de görüldüğü kaydedilmiştir (2). Bu türlerden *E. bovis* (%17,6-58,5), *E. zuernii* (%12,7-47,3), *E. auburnensis* (%4,5-64,7) ve *E. canadensis*'in (%4,1-64,7) en çok görülen türler, en az görülen türlerin ise *E. illinoisensis* (%1,6-4,8), *E. brasiliensis* (%0,8-8,3), ve *E. cylindrica* (%3,7-14,4) olduğu bildirilmiştir (3, 21, 22). *E. bovis* ve *E. zuernii* türlerinin dominant türler olduğu İngiltere (74), Almanya (75), Danimarka (76), Avusturya (71) ve Polonya (33) gibi çeşitli Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir. Çalışmamızda da morfolojik identifikasyon sonuçlarına göre yukarıdaki çalışmalara paralel olarak patojenik *Eimeria* türleri daha yaygın belirlenmiş olup en yaygın tür %76,5 ile *E. bovis* bulunmuş bunu sırasıyla %64,3 ile *E. zuernii*, %51,0 ile *E. auburnensis*, %44,9 ile *E. alabamensis*, %16,3 ile *E. cylindrica*, %6,1 ile *E. bukidnonensis* ve %4,1 ile *E. subspherica* türleri izlemiştir.

Çalışmamızda *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen hayvanlarda tek türle enfeksiyonlar görülmemiş olup en yüksek üç türle miks enfeksiyonlar saptanmış bunu sırasıyla iki, dört ve beş türle enfeksiyonlar izlemiştir. Bu sonuçlara paralel olarak Montero ve ark. (77) Costa Rica’da incelemesini yaptıkları buzağların %73’ünü miks enfekte olduğunu belirlemişlerdir. Çiçek ve ark. (22) Afyon bölgesinde sığırlarda miks enfeksiyonları (2-4 tür) %43,6 olarak saptamışlardır. Arslan ve Tüzer (21), Trakya bölgesinde sığırlarda miks enfeksiyonları tek türle enfeksiyonlara oranla yaklaşık 2,5 kat daha fazla belirlemişlerdir. Buna karşın Polonya, Fransa, Almanya ve Çek Cumhuriyeti’nde örneklenen sığırlar üzerinde yapılan çalışmalarda (33, 78, 79) tek türle enfeksiyon oranları daha yüksek saptanmıştır.

Çalışmada ayrıca *Eimeria* ookistleri ile pozitif belirlenen örneklerde patojenik *Eimeria* türlerinin moleküler identifikasyonu için Kawahara ve ark. (40) tarafından bildirilen ve ribozomal ITS-1 gen bölgesini hedef alan primer çiftleri ile PCR analizleri gerçekleştirilmiş ancak bu primer çiftlerinin non-spesifik amplikonlara yol açtığı ve bağlanma spesifitelerinin düşük olduğu gözlenmiştir. Bu açıdan patojenik *Eimeria* türlerinin kantitatif identifikasyonları için, son dönemde Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı bünyesinde sığır coccidiosis’i üzerine yürütülmekte olan proje çalışmalarında (50) standardizasyonu yapılmış olan TaqMan prob tabanlı real time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Nitekim geleneksel mikroskopi ve morfolojik teknikler tipik olarak coccidian ookistlerin identifikasyonu için kullanılmakta olup sıklıkla subjektif özelliktedir. Bununla birlikte bu teknikler önemli düzeyde parazitolojik uzmanlık gerektirmekte ve tür identifikasyonlarında güvenilirliği yüksek olmamaktadır (80). Ookistlerin fekal ve gıda örneklerinden izole edilmesi, saptanması ve identifikasyonundaki zorluklar *Eimeria*, *Sarcocystis*, *Isospora*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora* ve *Toxoplasma* gibi soylara ait türlerin oluşturdukları hastalıkların kesin olarak saptanamamasına ve dolayısıyla da hastalık salgın araştırmalarının ve etkin tedavi stratejilerinin ortaya konmasına engel teşkil etmektedir (81). Bu açıdan insan ve hayvanlarda coccidian ookistlerin saptanması için epidemiyolojik ve hastalık salgın araştırmalarında rutin kullanım amacıyla güvenilir moleküler tabanlı tekniklerle araştırmalara ihtiyaç ortaya çıkmıştır (80). Farklı Real Time PCR teknikleri birçok farklı bilimsel alanda kullanılmaktadır. Örneğin *Cryptosporidium parvum*’un insanlar için patojenik genetik varyantlarının (82, 83), çeşitli kanatlı *Eimeria* türleri (84, 85), *Borellia*

(86) ve *Plasmodium* (87), *Leishmania* organizma grupları (88) ile plum pox virus suşlarının (89) başarılı bir şekilde ayırımında ve tek nükleotid polimorfizmlerinin spesifik olarak belirlenmesinde (90, 91) Real Time PCR teknikleri yüksek özgünlükte kullanılmıştır. Çalışmamızda *Eimeria* türleri için DNA kopya sayısı düzeyinde en yüksek pozitiflik *E. bovis* için belirlenmiş bunu sırasıyla *E. zuernii*, *E. auburnensis* ve *E. alabamensis* izlemiş olup *E. ellipsoidalis* pozitifliği saptanmamıştır. Saptanan patojenik *Eimeria* türlerinin yaş gruplarına göre dağılımı incelendiğinde her tür için DNA kopya sayısı düzeyinde 1 yaş altı hayvanlarda pozitiflik daha yüksek belirlenmiş olup *E. alabamensis* dışında diğer türlerde bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Bununla birlikte dışkı karakterlerine göre patojenik *Eimeria* türlerinin dağılımında da her tür için kanlı ishaller ve ishaller dışkıları DNA kopya sayısı bazında pozitiflik normal dışkıları oranla istatistiksel açıdan daha yüksek düzeyde belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar morfolojik identifikasyon ve OPG düzeyleri ile de paralellik göstermiş olup buzağılarda ve genç sığırlarda ve özellikle ishal olgularında başta *E. bovis* ve *E. zuernii* enfeksiyonlarının risk oluşturan primer türler olduğunu kantitatif düzeyde de teyit etmiştir. Nitekim <3 ay grubu ve ishaller dışkı karakterinde olan örneklerde *E. bovis* ve *E. zuernii* pozitifliği de DNA kopya sayısı düzeyinde *E. auburnensis* ve *E. alabamensis* pozitifliklerine oranla daha yüksek belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli ( $p<0,05$ ) bulunmuştur.

*Eimeria* türlerinin identifikasyonu genel olarak sporlanmış ookistlerin morfolojisine dayanmaktadır. Ancak bazı türler birbirleri ile morfolojik benzerlik göstermektedir. Bu açıdan moleküler karakterizasyon birçok *Eimeria* türünün başarılı bir şekilde sınırlarının ayrılmasında ve filogenetik ilişkilerinin ortaya çıkarılmasında zorunlu hale gelmiştir (44). Small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) geni moleküler karakterizasyon için iyi bilinen bir markerdir. Kümes hayvanlarında, rodentlerde ve tavşanlarda parazitlenen çeşitli *Eimeria* türlerinin filogenetik ilişkilerinin araştırıldığı farklı çalışmalar (92-94) 18S rRNA sekansları ve *Eimeria* türlerinin morfolojisi temeline dayanmıştır. Ancak günümüze kadar sığır coccidiosis'ine yol açan *Eimeria* türlerinin 18S rRNA sekansları temelinde filogenetik yapılanması üzerine yalnızca Japonya'da sığırlardan izole edilmiş farklı 10 *Eimeria* türüne ait izolatların incelendiği yalnızca bir çalışma (44) bulunmaktadır. Bu çalışmada (44) incelenen izolatların tür bazlı olarak 3 monofiletik grupta yer aldığı ve her grupta yer alan türlere ait izolatların da benzer ookist morfolojisi

göstermediği belirlenmiştir. Çalışmamızda karakterize edilen *E. zuernii*, *E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis*, *E. cylindrica* ve *E. bukidnonensis* türlerine ait izolatların Japonya'dan bildirilen izolatlarla birlikte tür bazlı olarak cluster oluşturmuş olması da araştırmacıların bulgularını destekler nitelikte bulunmuştur. Bununla birlikte Japonya'da sığır *Eimeria* türlerinin ITS-1 gen bölgesi üzerine yürütülmüş olan diğer bir çalışmada toplam 6 türe ait izolatlar filogenetik olarak incelenmiş, 18S rRNA gen bölgesi filogenetik yapılanmasına benzer tarzda türlerin 3 farklı grupta kümelendiği belirlenmiş ancak *E. ellipsoidalis* izolatlarının farklı bir grup içerisinde yer aldığı görülmüştür. Kokuzawa ve ark. (44) ayrıca inceledikleri çoğu sığır *Eimeria* türü için değişik oranda intraspesifik sekans diversitesi belirlemişler ve bu diversitenin özellikle *E. alabamensis* ve *E. bukidnonensis* türlerinde daha yüksek olduğunu kaydetmişlerdir. Nitekim çalışmamızda da tür bazlı olarak izolatlarımız arasında ve aynı türe ait Japonya izolatları arasında farklı oranlarda intraspesifik sekans heterojenitesi belirlenmiştir. Yine *E. alabamensis* ERU-Eal1-Eal3 izolatlarının kendi aralarında ortalama  $0,7 \pm 0,2$ , *E. bukidnonensis* ERU-Ebu1 izolatının ise Japonya izolatlarıyla  $0,4 \pm 0,2$  en yüksek farklılığı göstermiş olması da Kokuzawa ve ark.nın (44) bulgularını destekler nitelikte değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Kayseri'nin Mahzemin yöresindeki sığırlarda coccidiosis'e yol açan *Eimeria* türlerinin moleküler prevalansı ve enfeksiyon yükleri kantitatif düzeyde ortaya konmuş olup patojenik *E. bovis* ve *E. zuernii* türlerinin primer yaygın türler olduğu ve özellikle buzağı ve genç sığırlarda ishal olgularının epidemiyolojisinde önem arz ettikleri belirlenmiştir. Çalışma ile ayrıca araştırma yöresinde patojenik *Eimeria* türlerinin moleküler karakterizasyonları yapılmış ve filogenetik yapılanmaları ortaya konmuştur. Türkiye'de sığır coccidiosis'i ile mücadele ve ekonomik kayıpların önüne geçilmesi için geniş çaplı moleküler epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

1. Dauschies A, Najdrowski M. Eimeriosis in cattle: current understanding. J Vet Med B, Inf Dis Vet Pub Heal 2005; 52: 417-427.
2. Karaer Z, Orkun Ö, Sürsal N. Sığır, Koyun ve Keçilerde Coccidiosis. Türkiye Klinikleri J Vet Sci 2012; 3:1-8.
3. Özer E, Şaki C. Türkiye’de Coccidiosis. In: Dinçer Ş, editor. Coccidiosis. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği; 2001. p. 151-162.
4. Hill NJ, Richter C, Power ML. Pinning down a polymorphic parasite: new genetic and morphological descriptions of *Eimeria macropodis* from the Tammar wallaby (*Macropus eugenii*). Parasitol Int 2012; 61: 461-465.
5. Cornelissen AW, Verstegen R, van den Brand H, et al. An observational study of *Eimeria* species in housed cattle on Dutch dairy farms. Vet Parasitol 1995;56(1-3):7-16.
6. Svensson C, Olofsson H, Uggla A. Immunisation of calves against *Eimeria alabamensis* coccidiosis. Appl Parasitol 1996; 37: 209-216.
7. Taylor MA, Catchpole J. Review article: coccidiosis of domestic ruminants. Appl Parasitol 1994; 35:73-86.
8. Levine N. Veterinary Protozoology. First edition ed. Ames: Iowa State Univ Press; 1985.
9. Arslan MÖ. Trakya yöresi sığırlarında Eimeriidae türlerinin yaygınlığı. İstanbul: Doktora Tezi. İstanbul Üniv. Sağ. Bil. Enst., Parazitoloji Anabilim Dalı; 1995.
10. Arslan MÖ, Sarı B. Coccidiosis. In: M.A Ö, İnci A, editors. Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları. 24. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği; 2013. p. 123-134.
11. Rehman TU, Khan MN, Sajid MS, et al. Epidemiology of *Eimeria* and associated risk factors in cattle of district Toba Tek Singh, Pakistan. Parasitol Res 2011; 108: 1171-1177.
12. Sanchez RO, Romero JR, Founroge RD. Dynamics of *Eimeria* ookist excretion in dairy calves in the Province of Buenos Aires (Argentina), during their first 2 months of age. Vet Parasitol 2008; 151: 133-138.
13. Parker RJ, Boothby K, Polkinghorne I, et al. Coccidiosis associated with post-weaning diarrhoea in beef calves in a dry tropical region. Aust Vet J 1984; 61: 181-183.

14. Lassen B. Diagnosis, Epidemiology and Control of Bovine Coccidiosis in Estonia. PhD thesis, Section of Parasitology, Department of Infectious Diseases, Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Estonian University of Life Sciences, Estonia; 2009.
15. Arslan MÖ, Sarı B, Kara M, ve ark. Research on the prevalence of *Eimeria* and *Cryptosporidium* species in cows in periparturient period in Kars region. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2012; 18: A65-A70.
16. Jolley WR, Bardsley KD. Ruminant coccidiosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2006; 22: 613-621.
17. Marshall RN, Catchpole J, Green JA, et al. Bovine coccidiosis in calves following turnout. Vet Rec 1998;143(13):366-367.
18. Parker RJ, Jones GW. Destruction of bovine coccidial ookists in simulated cattle yards by dry tropical winter weather. Vet Parasitol 1990; 35: 269-272.
19. Arslan MO. Prevalance of *Eimeria* species in calves in Kars province, Turkey. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 1997; 3: 141-149.
20. Ernst JV, Stewart TB, Witlock DR. Quantitative determination of coccidian ookists in beef calves from the coastal plain area of Georgia (U.S.A.). Vet Parasitol 1987; 23: 1-10.
21. Arslan MÖ, Tüzer E. Prevalence of bovine eimeridosis in Thracia, Turkey. Türk Vet Hay Derg 1998; 22: 161-164.
22. Cicek H, Sevimli F, Kozan E, et al. Prevalence of coccidia in beef cattle in western Turkey. Parasitol Res 2007; 101: 1239-1243.
23. Aktaş MS, Sarı B, Arslan MÖ. Prevalence of *Eimeria* species in dairy calves of Erzurum and vicinity. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2008; 14: 25-29.
24. Değer S, Biçek K, Gül A, ve ark. Van yöresi buzağı ve danalarında *Eimeria* türlerinin yaygınlığı. Yüzüncü Yıl Univ Sağlık Bil Derg 2001; 7: 69-72.
25. Dumanlı N, Güler S, Erdoğan Z, et al. The incidence of coccidia species found in cattle in Elazığ province of Turkey. Doğa, Türk Vet Hay Derg 1993; 17: 223-227.
26. Göz Y, Aydın A. Prevalence of coccidiosis agents in calves in the Yüksekova (Hakkari) Region. Türkiye Parazitoloj Derg 2005; 29:13-16.
27. Gül A, Biçek K, Değer S. Van belediye mezbahasında kesimi yapılan sığırlarda bulunan *Eimeria* türleri ve bunların yayılış oranları. Yüzüncü Yıl Univ Vet Fak Derg 2000; 11: 12-14.
28. Gül A, Çiçek M, Kılınç Ö. Prevalence of *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in calves in the Van Province. Türkiye Parazitoloj Derg 2008; 32: 202-204.
29. Güleğen AE, Okursoy S. Coccidia species and their prevalence in cattle in the province of Bursa. Türkiye Parazitoloj Derg 2000; 24: 297-303.
30. Güven E, Nalbantoğlu S, Orkun Ö, et al. Prevalance of *Eimeria* species in cattle in Mucur District of Kırşehir. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2010; 16: 483-486.
31. Mimioğlu M, Göksu K, Sayın F. Ankara ve civarı sığırlarında coccidiosis olayları üzerine araştırmalar. Ankara Univ Vet Fak Derg 1956; 3: 136-158.

32. Sayin F. The species of *Eimeria* occurring in cattle in Turkey. Ankara Univ Vet Fak Derg. 1970;17:311-26.
33. Tomczuk K, Grzybek M, Szczepaniak K, et al. Analysis of intrinsic and extrinsic factors influencing the dynamics of bovine *Eimeria* spp. from central-eastern Poland. Vet Parasitol 2015; In press, doi:10.1016/j.vetpar.2015.09.027.
34. Svensson C, Ugglå A, Pehrson B. *Eimeria alabamensis* infection as a cause of diarrhoea in calves at pasture. Vet Parasitol 1994; 53: 33-43.
35. Collins JE, Dubey JP, Rossow KD. Hepatic coccidiosis in a calf. Vet Pathol 1988; 25: 98-100.
36. Veronesi F, Diaferia M, Viola O, et al. Long-term effect of toltrazuril on growth performances of dairy heifers and beef calves exposed to natural *Eimeria zuernii* and *Eimeria bovis* infections. Vet J 2011; 190: 296-299.
37. Hoblet KH, Charles TP, Howard RR. Evaluation of lasalocid and decoquinate against coccidiosis resulting from natural exposure in weaned dairy calves. Am J Vet Res 1989; 50: 1060-1063.
38. Faber JE, Kollmann D, Heise A, et al. *Eimeria* infections in cows in the periparturient phase and their calves: oocyst excretion and levels of specific serum and colostrum antibodies. Vet Parasitol 2002; 104: 1-17.
39. Oda K, Nishida Y. Prevalence and distribution of bovine coccidia in Japan. Nihon Juigaku Zasshi Japanese J Vet Sci 1990; 52: 71-77.
40. Kawahara F, Zhang G, Mingala CN, et al. Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS-1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites. Vet Parasitol 2010; 174: 49-57.
41. Long PL, Joyner LP. Problems in the identification of species of *Eimeria*. J Protozool 1984; 31: 535-541.
42. Li G, Xiao S, Zhou R, et al. Molecular characterization of *Cyclospora*-like organism from dairy cattle. Parasitol Res 2007; 100: 955-961.
43. Kaya G. Phylogenetic analyses of five sheep infective *Eimeria* species and development of a novel total nucleic acid extraction method from small numbers of *Eimeria* oocysts [PhD]. England: University of Bristol; 1998.
44. Kokuzawa T, Ichikawa-Seki M, Itagaki T. Determination of phylogenetic relationships among *Eimeria* species, which parasitize cattle, on the basis of nuclear 18S rDNA sequence. J Vet Med Sci / Japanese Soc Vet Sci 2013; 75: 1427-1431.
45. Ogedengbe JD, Hanner RH, Barta JR. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). Int J Parasitol 2011; 41: 843-850.
46. Schwarz RS, Jenkins MC, Klopp S, et al. Genomic analysis of *Eimeria* spp. populations in relation to performance levels of broiler chicken farms in Arkansas and North Carolina. J Parasitol 2009; 95: 871-880.
47. Duszynski DW, Wilber PG. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. J Parasitol 1997; 83: 333-336.

48. Lassen B, Jarvis T. *Eimeria* and *Cryptosporidium* in Lithuanian cattle farms. Vet Med Zoot 2009; 24-28.
49. Gajadhar AA. Host specificity studies and ookist description of a *Cryptosporidium* sp. isolated from ostriches. Parasitol Res 1994; 80: 316-319.
50. Yıldırım A, Düzlü Ö, İnci A. İç Anadolu Yöresinde Sığır Coccidiosis'ine Yol Açan Patojen *Eimeria* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Teşhiste Türe Özgü Real Time PCR Tekniğinin Geliştirilmesi. TÜBİTAK, 113 O 597, 2. Gelişme Raporu; 2015.
51. Velkers FC, Blake DP, Graat EA, et al. Quantification of *Eimeria acervulina* in faeces of broilers: comparison of McMaster ookist counts from 24h faecal collections and single droppings to real-time PCR from cloacal swabs. Vet Parasitol 2010; 169: 1-7.
52. Rind R, Brohi M. Factors affecting the survival and sporulation of *Eimeria* ookists of cattle. Pakistan J Biol Sci 2001; 4: 487-491.
53. Courtney CH, Ernst JV, Benz GW. Redescription of ookists of the bovine coccidia *Eimeria bukidnonensis* Tubangui 1931 and *E. wyomingensis* Huizinga and Winger 1942. J Parasitol 1976; 62: 372-376.
54. Levine N, Ivens V. The Coccidian Parasites (Protozoa, Sporozoa) of Ruminants. University of Illinois Press, No. 44, London, 1970.
55. Zhang L, Ning C, He Q, et al. Survey of the epidemiology of dairy cow coccidiosis in Zhengzhou, Henan Province, China and identification of coccidia species. J Henan Agric Univ 2000; 34: 88-93.
56. Lalonde LF, Gajadhar AA. Highly sensitive and specific PCR assay for reliable detection of *Cyclospora cayetanensis* ookists. Appl Environ Microbiol 2008; 74: 4354-4358.
57. Yang R, Fenwick S, Potter A, et al. Molecular characterization of *Eimeria* species in macropods. Exp Parasitol 2012; 132: 216-221.
58. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 2012; 28: 1647-1649.
59. Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007; 24: 1596-1599.
60. Lucas AS, Swecker WS, Lindsay DS, et al. A study of the level and dynamics of *Eimeria* populations in naturally infected, grazing beef cattle at various stages of production in the Mid-Atlantic USA. Vet Parasitol 2014; 202: 201-206.
61. Fitzgerald PR. The economic impact of coccidiosis in domestic animals. Adv Vet Sci Comp Med 1980; 24: 121-143.
62. Bangoura B, Dauschies A, Fuerll M. Influence of experimental *Eimeria zuernii* infection on clinical blood chemistry in calves. Vet Parasitol 2007; 150: 46-53.
63. Mundt HC, Dauschies A, Uebe F, et al. Efficacy of toltrazuril against artificial infections with *Eimeria bovis* in calves. Parasitol Res 2003; 90: S166-167.

64. Heidari H, Sadeghi-Dehkordi Z, Moayedi R, et al. Occurrence and diversity of *Eimeria* species in cattle in Hamedan province, Iran. *Veterinární Medicína* 2014; 59: 271-275.
65. Pilarczyk B, Ramisz A, Jastrzefski G. Internal parasites of cattle in select Western Pomerania farms. *Wiad Parazytol* 2002; 48: 383-390.
66. Autzen S, Maddox-Hyttel C, Monrad J. Infection with *Eimeria* species in calves: evaluation of risk factors and association between diarrhoea and ookist excretion. *Dansk Veterinærtidsskrift* 2002; 85: 6-10.
67. Nielsen BK, Thamsborg SM, Kristensen T. Feed supplements for young dairy breed calves after turn-out to pasture: effect on weight gain and subclinical coccidiosis in organic production systems. *Acta Agric Scand A* 2003; 53: 1-10.
68. Klockiewicz M, Kaba J, Tomczuk K, et al. The epidemiology of calf coccidiosis (*Eimeria* spp.) in Poland. *Parasitol Res* 2007; 101: S121-S128.
69. Matjila PT, Penzhorn BL. Occurrence and diversity of bovine coccidia at three localities in South Africa. *Vet Parasitol* 2002; 104: 93-102.
70. von Samson-Himmelstjerna G, Epe C, Wirtherle N, et al. Clinical and epidemiological characteristics of *Eimeria* infections in first-year grazing cattle. *Vet Parasitol* 2006; 136: 215-221.
71. Koutny H, Joachim A, Tichy A, et al. Bovine *Eimeria* species in Austria. *Parasitol Res* 2012; 110: 1893-1901.
72. Niilo L. Bovine coccidiosis in Canada. *Canadian Vet J* 1970; 11: 91-98.
73. Gräfner G, Graubmann HD, Daetz H, et al. Epidemiology of *Eimeria alabamensis* coccidiosis in young cattle. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 1985; 40: 44-47.
74. Stewart ID, Smith RP, Ellis-Iversen J. *Eimeria* species in cattle on farms in England and Wales. *Vet Rec* 2008; 162: 482-483.
75. Bangoura B, Mundt HC, Schmaschke R, et al. Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German cattle herds and factors influencing ookist excretion. *Parasitol Res* 2012; 110: 875-881.
76. Enemark HL, Dahl J, Enemark JM. Eimeriosis in Danish dairy calves--correlation between species, ookist excretion and diarrhoea. *Parasitol Res* 2013; 112: 169-176.
77. Montero V, Molina MA, Chinchilla M. *Eimeria* of calves in Coronada County: prevalence and identification. *Ciencias Veterinarias (Heredia)* 1990; 12: 21-24.
78. Farkas R, Szeidemann Z, Majoros G. Studies on coccidiosis of calves in Hungarian dairy farms. *Parasitol Res* 2007; 101: S113-S120.
79. Pilarczyk B, Pilarczyk R, Binerowska B, et al. Prevalence of *Eimeria* protozoa in cows imported to Poland from the Czech Republic, France, and Germany. A preliminary study. *Bulletin of the Veterinary Institute in Puławy* 2011; 55: 203-206.
80. Lalonde LF, Gajadhar AA. Detection and differentiation of coccidian ookists by real-time PCR and melting curve analysis. *J Parasitol* 2011; 97: 725-730.
81. Gajadhar AA, Allen JR. Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites. *Vet Parasitol* 2004; 126: 3-14.

82. Pangasa A, Jex AR, Campbell BE, et al. High resolution melting-curve (HRM) analysis for the diagnosis of cryptosporidiosis in humans. *Mol Cell Probes* 2009; 23: 10-15.
83. Ramirez NE, Sreevatsan S. Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. *Vet Parasitol* 2006; 136: 201-213.
84. Kirkpatrick NC, Blacker HP, Woods WG, et al. A polymerase chain reaction-coupled high-resolution melting curve analytical approach for the monitoring of monospecificity of avian *Eimeria* species. *Avian Pathol* 2009;38(1):13-9.
85. Vrba V, Blake DP, Poplstein M. Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken. *Vet Parasitol* 2010; 174: 183-190.
86. Rauter C, Oehme R, Diterich I, et al. Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 36-43.
87. Safeukui I, Millet P, Boucher S, et al. Evaluation of FRET real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of *Plasmodium* species in returning travellers and migrants. *Malaria J* 2008; 7: 70.
88. Schulz A, Mellenthin K, Schonian G, et al. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1529-1535.
89. Varga A, James D. Detection and differentiation of Plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. *J Virol Methods* 2005; 123: 213-220.
90. Graham R, Liew M, Meadows C, et al. Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting. *Clin Chem* 2005; 51: 1295-1298.
91. Zhou L, Myers AN, Vandersteen JG, et al. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clin Chem* 2004; 50: 1328-1335.
92. Barta JR, Martin DS, Liberator PA, et al. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *J Parasitol* 1997; 83: 262-271.
93. Kvicerova J, Pakandl M, Hypsa V. Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. *Parasitology* 2008; 135: 443-452.
94. Zhao X, Duszynski DW. Phylogenetic relationships among rodent *Eimeria* species determined by plastid ORF470 and nuclear 18S rDNA sequences. *Int J Parasitol* 2001; 31: 715-719.

**ERCİYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ  
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI  
KAYSERİ-TÜRKİYE**

**ETİK KURULUN ADI** : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

**ETİK KURULUN ADRESİ** : Erc.Üni. Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi

**Tarih:** 13.02.2013

**Toplantı Sayısı:** 02

**Karar No:** 13/32

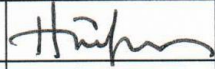
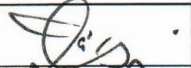
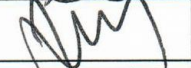
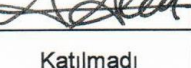
Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

**13.02.2013**

tarihinde

**Prof. Dr. Harun ÜLGER**

Başkanlığı'nda toplanmıştır.

| Üye Adı/Soyadı   | Unvanı                  | Bölümü                         | İmza                                                                                  |
|------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Harun Ülger      | Prof. Dr                | Tıp Fakültesi                  |    |
| Abdullah İnci    | Prof. Dr.               | Vet. Fakültesi                 |    |
| Özlem Canöz      | Prof. Dr                | Tıp Fakültesi                  |                                                                                       |
| Coşkun Tez       | Prof. Dr                | Fen Fakültesi                  |    |
| Fusun F. Erdoğan | Prof. Dr.               | Tıp Fakültesi                  |    |
| Ahmet Öztürk     | Doç. Dr.                | Tıp Fakültesi                  |   |
| M. Betül Aycan.  | Doç. Dr.                | Ecz. Fakültesi                 |  |
| Gökçen Y. Çelik  | Doç. Dr.                | Ecz. Fakültesi                 |  |
| Servet Kesim     | Yrd. Doç. Dr.           | Diş Hekimliği Fakültesi        |  |
| Aydın ALAN       | Yrd. Doç. Dr.           | DEKAM                          |  |
| Asiye Gökbelen   | Yar. Sevenler Der. Baş. | Sivil top. kuruluşu temsilcisi | Katılmadı                                                                             |
| Serap A. Eroğlu  | Avukat                  | Kurumla ilişkisi olmayan üye   | Katılmadı                                                                             |

Üniversitemiz Veteriner Fakültesinden **Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM** tarafından sunulan "**İç Anadolu Yöresinde Sığır Coccidiosis'ine Yol Açan Patojen Eimeria Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Teşhiste Türe Özgü Real Time PCR Tekniğinin Geliştirilmesi**" adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına **oy birliğiyle** karar verildi.

**Tarih :** 13.02.2013

**Etik Kurul Başkanı :** Prof. Dr. Harun ÜLGER

**İmzası**



ASLININ AYNIĞIDIR

  
**Prof. Dr. Harun ÜLGER**  
Erciyes Üniversitesi  
Hayvan Deneyleri  
Yerel Etik Kurul Başkanı

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı, Soyadı:** Muzaffer HATIRNAZ

**Uyruğu:** (TC)

**Doğum Tarihi ve Yeri:** 5 Ağustos 1983, Kayseri

**Medeni Durumu:** Evli

**Tel:** +90 544 5609778

**email:** muzafferhatirnaz1@gmail.com

**Yazışma Adresi:** Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı,  
Melikgazi/ KAYSERİ

### EĞİTİM

| Derece        | Kurum                                                                     | Mezuniyet Tarihi |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Lise          | Gazi Lisesi/Antalya                                                       | 2000             |
| Lisans        | Fırat Üniversitesi<br>Veteriner Fakültesi                                 | 2005             |
| Yüksek Lisans | Erciyes Üniversitesi<br>Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Parazitoloji |                  |

### İŞ DENEYİMLERİ

| Yıl  | Kurum                               | Görev           |
|------|-------------------------------------|-----------------|
| 2011 | Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı | Veteriner Hekim |

### YABANCI DİL

İngilizce