T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

KONYA YÖRESİNDEKİ İSHALLİ BUZAĞILARDA *CRYPTOSPORIDIUM* İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Proje No: **TSA-11-3748**

Proje Türü
Normal Araştırma Projesi (NAP)

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Prof. Dr. Ferda SEVİNÇ
Selçuk Ü. Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Prof. Dr. Abdullah İNCİ
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Doç. Dr. Özlem DERİNBAY EKİCİ
Selçuk Ü. Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Araş.Gör. Dr. Nermin IŞIK
Selçuk Ü. Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Öğr.Gör. Zuhal ÖNDER
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Araş.Gör. Arif ÇİLOĞLU
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Mayıs 2013
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Araştırıcılar, bu çalışmaya TSA-11-3748 kod numaralı proje ile maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederler.

KONYA YÖRESİNDEKİ İSHALLİ BUZAĞILARDA *CRYPTOSPORIDIUM* İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Bu çalışmada, Konya yöresinde 2 aylığa kadar olan ishalli buzağılardan toplanan toplam 250 dışkı örneğinde *Cryptosporidium* türlerinin moleküler prevalansının saptanması ve karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır. Buzağıların yaş, cinsiyet ve ırkları örnek toplama tarihleriyle birlikte kaydedilmiştir. Dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* oocystleri Modifiye-Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle araştırılmıştır. Dışkı örneklerinden DNA ekstraksiyonunu takiben, *Cryptosporidium* spp. ve *C. parvum* için sırasıyla 18S rRNA ve polimorfik bir gen bölgesi amplifiye eden spesifik primerlerle TaqMan prob bazlı Real Time analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca tüm örnekler *Cryptosporidium* small subunit (SSU) rRNA geni yönünden Nested-PCR analizine tabii tutulmuştur. İncelemesi yapılan buzağılardan toplam 92 (%47,4), 104 (%53,6) ve 84'ü (%43,3) sırasıyla mikroskobik, Real Time PCR ve Nested PCR analizleriyle cryptosporidiosis yönünden pozitif bulunmuştur. Tür spesifik Real Time PCR analizleriyle tüm pozitif örneklerin *C. parvum* olduğu saptanmıştır. Ayrıca pozitif belirlenen buzağılarda *Cryptosporidium* tür ve genotiplemesi ile aynı zamanda miks enfeksiyonların belirlenebilmesi amacıyla Nested PCR sonrası elde edilen amplikonlara VspI, SspI ve MboII restriksiyon enzimleri kullanılarak RFLP analizi uygulanmıştır. Her üç restriksiyon enzimi ile uygulanan RFLP sonuçlarına göre, Nested PCR'da reaksiyon gösteren tüm örneklerin *C. parvum* ile identik bant profilleri gösterdiği ve miks enfeksiyonların bulunmadığı belirlenmiştir. Nested PCR ve RFLP sonuçlarının konfirmasyonu amacıyla uygun DNA bant profilleri ve konsantrasyona sahip 3 *C. parvum* izolatı 18S rRNA gen bölgesi yönünden sekanslanmıştır. 18S rRNA gen bölgesinin filogenetik analizi sonucunda, bu üç izolatın kendi aralarında %100 identik oldukları, Türkiye'deki GenBank'a kayıtlı *C. parvum* izolatlarıyla da ortalama %0,3 farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca *C. parvum*'un alt genotiplerinin belirlenmesi amacıyla toplam 10 izolat GP60 gen bölgesi yönünden sekans analizine tabi tutulmuş ve sadece zoonotik IIaA13G2R1 alt genotipi tespit edilmiştir. Cryptosporidiosis yönünden mikroskobik ve Nested PCR sonuçlarının Real Time PCR sonuçları ile karşılaştırmalı analizleri yapıldığında, mikroskobik teşhisin sensitivitesi %75,0 ve spesifitesi %84,4 belirlenirken Nested PCR'ın sensitivitesi %80,8 ve

spesifitesi de %100,0 olarak saptanmıştır. Özellikle düşük parazitemili hayvanlar başta olmak üzere Real Time PCR yönteminin *Cryptorposidium* enfeksiyonlarının teşhisinde en duyarlı test olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma, Konya yöresinde sığır cryptosporidiosis'ine yol açan türlerin moleküler karakterizasyonlarının ortaya konulduğu ilk çalışmadır. Araştırma yöresinde primer yaygınlık gösteren tür *C. parvum* olarak belirlenmiş ve bu türün sahip olduğu zoonotik potansiyel ile halk sağlığı için risk oluşturduğu ortaya çıkmıştır. Bu parazitin zoonotik karakteri, halk sağlığı açısından özellikle yetiştiriciler, veteriner hekimler, epidemiyologlar ve halk sağlığı uzmanlarının işbirliğinde risk faktörlerinin değerlendirilmesini ve etkin kontrol ve mücadele stratejilerinin geliştirilmesini gerektirmektedir. Ayrıca bu çalışma Türkiye'de sığır cryptosporidiosis'inin moleküler epidemiyolojisi ve hastalıktan sorumlu türler ve genotiplerin ortaya konması yönünde daha sonra yapılacak araştırmalara model olma niteliğindedir.

Anahtar kelimeler: Konya, Cryptosporidiosis, Moleküler Karakterizasyon, Prevalans, Buzağı

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *CRYPTOSPORIDIUM* ISOLATES FROM CALVES WITH DIARRHEA IN KONYA PROVINCE

ABSTRACT

This study was carried out to determine the prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* species in totally 250 faecal samples collected from up to 2 months calves with diarrhea in Konya province. The ages, genders and breeds of calves were recorded with the collection dates. Modified-Ziehl-Neelsen Staining technique was used to investigate *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples. After the genomic DNA extraction from the fecal samples, TaqMan probe based real time PCR analyses were carried out with *Cryptosporidium* spp. and *C. parvum* specific primer pairs which amplify different size regions of partial 18S rRNA and a polymorphic gene, respectively. Furthermore all samples were analyzed by Nested PCR for the amplification of small subunit (SSU) rRNA gene region. Totally 92 (47.4%), 104 (53.6%) and 84 (43.3%) out of examined samples were found positive by microscopic, Real Time PCR and Nested PCR analyses, respectively. All positive samples were identified as *C. parvum* by Real Time PCR species specific assays. The amplicons obtained by Nested PCR from the positive calves which were further analyzed by RFLP using VspI, SspI and MboII restriction enzymes in order to determine the genotypes and mix infections. According to the RFLP results, all samples which exhibited reaction in Nested PCR showed specific DNA band profiles for *C. parvum* with all three restriction enzymes and no mix infections were determined. Three *C. parvum* isolates which had suitable DNA band profiles and concentrations were sequenced with respect to 18S rRNA gene region in order to confirm the PCR and RFLP results. The phylogenetic analyzes of 18S rRNA gene region revealed that the 3 *C. parvum* isolates showed 100% identity with each other and 0.3% genetic distance with *C. parvum* isolates from Turkey available in GenBank. Furthermore, in order to subgenotyping of *C. parvum*, 10 isolates were used for DNA sequence analysis of the GP60 gene region and only one zoonotic subtype IIaA13G2R1 was determined. When comparing the microscopical identification and Nested PCR results with the results of Real Time PCR assay, the sensitivity and specificity were determined as 75.0% and 84.4% for microscopic identification, 80.8% and 100.0% for Nested PCR. The Real Time PCR assay was

found to be the most sensitive technique for identifying *Cryptosporidium* infections especially in animals with lower parasitemia.

In conclusion, the obtained results from this study are the first molecular characterization data for the species which cause bovine cryptosporidiosis in Konya region. *C. parvum* was found to be the most prevalent species in the region, and it has a zoonotic potential for human population. Since its zoonotic character, this parasite requires a risk assessment, especially for improving the knowledge of control measures by breeders, veterinarians, epidemiologists and public health specialists in Turkey. This study also provides useful insights into the epidemiology of bovine cryptosporidiosis in Turkey and it could be a model for future molecular epidemiological studies.

Key words: Konya, Calf, Cryptosporidiosis, Molecular Characterization, Prevalence

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

KAPAK ..... **I**
TEŞEKKÜR ..... **III**
ÖZET ..... **IV**
ABSTRACT ..... **VI**
İÇİNDEKİLER ..... **VIII**
TABLO LİSTESİ ..... **X**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **XI**

1. GİRİŞ/ AMAÇ VE KAPSAM **1**
2. GENEL BİLGİLER **2**
2.1. SINIFLANDIRMA 2
2.2. HASTALIĞIN EPİDEMİYOLOJİSİ 4
2.2.1. CRYPTOSPORİDİOSİS'İN TÜRKİYE'DEKİ YAYILIŞI 4
2.2.2. CRYPTOSPORİDİOSİS'İN DÜNYADAKİ YAYILIŞI 6
2.3. HASTALIK ETKENİNİN YAŞAM DÖNGÜSÜ VE ÇOĞALMASI 6
2.3.1. EKSKİSTASYON 7
2.3.2. MEROGONİ 7
2.3.3. GAMETOGONİ 7
2.3.4. FERTİLİZASYON 7
2.3.5. OOCYST DUVAR OLUŞUMU 7
2.3.6. SPOROGONİ 8
2.4. PATOJENİTE 8
2.5. KLİNİK BELİRTİLER 9
2.6. HASTALIĞIN TANISI 10
2.6.1. MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ 11
2.7. İMMUNİTE VE ANTİJENİK YAPI 13
2.8. TEDAVİ 14
2.9. KORUNMA VE KONTROL 14
2.10. HASTALIĞA BAĞLI EKONOMİK KAYIPLAR 15
3. GEREÇ VE YÖNTEM **17**
3.1. HAYVAN MATERYALİ VE KAN ÖRNEKLERİ 17

3.1.1. Araştırma Sahasi ve Buzağilarin Örneklenmesi 17
3.2. Laboratuar Çalişmalari 17
3.2.1. Modifiye-Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemiyle Dişki Muayenesi .. 17
3.2.2. Genomik DNA Ekstraksiyonu 17
3.2.3. Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) 18
3.2.4. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)..... 19
3.2.5. Sekans ve Filogenetik Analizler 20
3.2.5.1. Cryptosporidium Small Subunit (SSU) rRNA Geninin Sekansi ve Filogenetik Analizi 20
3.2.5.2. C. parvum 60 kDa glycoprotein (GP60) Geninin Sekansi ve Filogenetik Analizi 21
3.3. İstatistiksel Analiz 22
4. BULGULAR 24
4.1. Modifiye-Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemiyle Dişki Muayenesi Sonuçlari 24
4.2. Real Time PCR Sonuçlari 24
4.3. SSU rRNA Nested PCR Sonuçlari 26
4.4. Cryptosporidiosis'in Teşhisinde Kullanilan Yöntemlerin Kiyaslanmasi 27
4.5. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ile Cryptosporidium İzolatlarinin Genotiplendirilmesi 28
4.6. Cryptosporidiosis'in Moleküler Prevalansinda Bazi Epidemiyolojik Faktörlerin Analizi 29
4.7. Sekans ve Filogenetik Analizler 30
4.7.1. Cryptosporidium Small Subunit (SSU) rRNA Geninin Sekansi ve Filogenetik Analizi 30
4.7.2. C. parvum 60 kDa Glycoprotein (GP60) Geninin Sekansi, Filogenetik Analizi ve Genotiplerin Belirlenmesi 40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 56
6. KAYNAKLAR 67

TABLO LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 2.1. *Cryptosporidium'*un sınıflandırılması, bazı önemli türler ve bulunduğu konaklar....2

Tablo 3.1. 2012-2013 yılları arasında Konya yöresinde örneklenen buzağıların toplama merkezi yaş, ırk ve cinsiyete göre dağılımları 17

Tablo 3.2. *C. parvum* ve *Cryptosporidium* sp. için Real Time PCR'da kullanılan primer ve TaqMan problar....18

Tablo 4.1. İncelenen hayvanlarda mikroskobik, Nested PCR ve Real Time PCR analiz sonuçları....27

Tablo 4.2. İncelenen hayvanlarda mikroskobik, Nested PCR ve Real Time PCR analiz sonuçlarının karşılaştırılması 27

Tablo 4.3. Pozitif örneklerde SspI ve MboII restriksiyon enzimleri ile RFLP sonrası belirlenen bant profilleri....28

Tablo 4.4. Buzağılarda cryptosporidiosis prevalansının *Cryptosporidium* türlerine göre yaş, cinsiyet ve ırkla ilişkisi 29

Tablo 4.5. *C. parvum* pozitif belirlenen örneklerde saptanan Ct (dR) değerelerinin sığırların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımı....30

Tablo 4.6. Konya yöresinde buzağılarda belirlenen izolatların incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler ve GenBank aksesyon numaraları 31

Tablo 4.7. Türkiye ve Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer *Cryptosporidium* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler 32

Tablo 4.8. Konya yöresinde buzağılarda belirlenen *C. parvum* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak ve izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen genotipleri ve GenBank aksesyon numaraları....40

Tablo 4.9. Türkiye ve Dünyadan GP60 gen bölgesi yönünden filogenetik kıyaslaması yapılan buzağılardaki diğer C. parvum alt genotiplerine ait izolatların aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler 45

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no

Şekil 2.1. *Cryptosporidium* türlerinin yaşam döngüsü.....8
Şekil 2.2. Carbol fuchsin boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* oocystleri 11
Şekil 4.1. Modifiye-Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* sp. olarak değerlendirilen oocystler. 24
Şekil 4.2. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu *C. parvum* pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon grafikleri.....25
Şekil 4.3. *C. parvum* pozitif saptanan örneklerin duplex TaqMan Real Time PCR da amplifikasyon grafikleri.....25
Şekil 4.4. Real Time PCR'da *C.parvum* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı.....26
Şekil 4.5. *Cryptosporidium* türlerinin parsiyel SSU rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü ……. 26
Şekil 4.6. Bazı *C. parvum* pozitif izolatlarda parsiyel SSU rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası elde edilen ürünlerin SspI (1-4) ve MboII (5-8) restriksiyon enzimleri ile RFLP analizleri sonucu belirlenen bant profillerinin jel elektroforezde görünümü.....28
Şekil 4.7. Bazı *C. parvum* pozitif izolatlarda (1-6) parsiyel SSU rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası elde edilen ürünlerin VspI restriksiyon enzimi ile RFLP analizleri sonucu belirlenen bant profillerinin jel elektroforezde görünümü 29
Şekil 4.8. *C. parvum* TrKonCpar5 izolatının parsiyel 18S rRNA sekans dizilimi.....31
Şekil 4.9. *C. parvum* TrKonCpar6 izolatının parsiyel 18S rRNA sekans dizilimi.....31
Şekil 4.10. *C. parvum* TrKonCpar10 izolatının parsiyel 18S rRNA sekans dizilimi.....31
Şekil 4.11. GenBank'a kayıtları yapılan Konya izolatlarıyla Türkiye ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların SSU rRNA gen dizilimlerinin pairwise analizleri. 33
Şekil 4.12. Konya yöresinde buzağılarda belirlenen *C. parvum* izolatları ile Türkiye ve Dünyadaki diğer bazı *Cryptosporidium* izolatlarının parsiyel SSU rRNA gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları. 38
Şekil 4.13. Konya yöresinde saptanan *C. parvum* izolatları ile GenBank'a kayıtlı Türkiye ve Dünyadan diğer bazı izolatların SSU rRNA gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri...39
Şekil 4.14. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar1 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları 40
Şekil 4.15. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar2 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları 41
Şekil 4.16. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar3 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları 41
Şekil 4.17. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar4 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları. 42
Şekil 4.18. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar5 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları. 42
Şekil 4.19. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar6 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları. 43
Şekil 4.20. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar7 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları. 43

Şekil 4.21. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar8 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları. 44
Şekil 4.22. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar9 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları. 44
Şekil 4.23. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar10 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları 45
Şekil 4.24. GenBank'a kayıtları yapılan Konya izolatlarıyla Türkiye ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların GP60 gen dizilimlerinin pairwise analizleri. 47
Şekil 4.25. Konya yöresinde buzağılarda belirlenen *C. parvum* alt genotiplerine ait izolatlar ile Türkiye ve Dünyadaki diğer bazı *C. parvum* alt genotiplerine ait izolatlarının GP60 gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları 54
Şekil 4.26. Buzağılarda belirlenen *C. parvum* alt genotiplerine ait izolatlar ile GenBank'a kayıtlı buzağılardaki diğer bazı alt genotiplere ait izolatların GP60 gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri …… 55

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Türkiye'de parazit hastalıkları insan ve hayvanlarda sıklıkla görülmektedir. Bunlardan bazıları zoonotik karakterdedir. Bu enfeksiyonlardan biri olan cryptosporodiosis özellikle yeni doğanlarda ve immun supresif bireylerde enfeksiyona neden olmaktadır. Türkiye'de yeni doğan buzağılarda, cryptosporodiosis'den kaynaklanan hastalık ve ölüm olayları büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. *Cryptosporodium* türlerinden *C. parvum*'un konak spesifitesi yoktur ve birçok omurgalıyı enfekte edebilir. Hayvancılıkla uğraşanlar, veteriner hekimler, laboratuar personeli, endemik bölgelere yolculuk edenler, hijyenik koşulların yetersiz olduğu yerlerde yaşayanlar ve enfekte kişilerle yakın temas edenlerde enfeksiyonun prevalansı yüksektir. *Cryptosporidium* oocystlerinin bulaşmasında su önemli faktörlerden biri olup bunu gıdalar ve hayvan-insan arasındaki bulaşmalar izlemektedir. Ahırda bulunan ve periyodik temizliği yapılmayan su tanklarından ve meralardaki durgun göl ve göletlerden su içen hayvanlar enfeksiyonu daha da yaymaktadır.

Türkiye'de günümüze kadar sığırlarda cryptosporidiosis üzerine çalışmaların daha çok konvansiyonel parazitolojik yöntemlerle yapıldığı görülmekte olup moleküler çalışmaların sayısının çok sınırlı olduğu görülmüştür. Hâlbuki cryptosporidiosis'de bulaşma dinamiklerinin belirlenmesi, epidemiyolojik faktörlerin analizi ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde enfeksiyona yol açan tür ve genotiplerin saptanması oldukça önemlidir.

Bu proje önerisinde hayvancılığın önemli bir geçim kaynağı olduğu Konya yöresindeki iki aylığa kadar ishal tablosu gösteren buzağılardan toplanmış dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* tür ve genotiplerinin Real Time PCR ve PCR-RFLP teknikleri ile moleküler olarak araştırılması, saptanan izolatların small subunit ribosomal RNA (SSU-rRNA) ve 60 kDa glycoprotein (GP60) gen bölgelerinin sekanslanması sonucu filogenetik analizleri ile GenBank'ta bildirilen tür, alt tür ya da genotiplerle karşılaştırılmaları ve moleküler olarak karakterize edilmeleri amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Son yıllarda önemli olduğu ortaya konulan bağırsak protozoon enfeksiyon etkenlerinden *Cryptosporidium* türleri, evcil hayvanlar ve insanlar başta olmak üzere oldukça geniş bir konakçı spektrumuna sahiptirler. *Cryptosporidium* ilk kez 1895 yılında Clarke tarafından fark edilerek "fare mide epiteli üzerinde yer alan spor kümeleri" şeklinde tarif edilmiş ve bundan yaklaşık 12 yıl sonra 1907 yılında Tyzzer tarafından tanımlamış ve 1910 yılında aynı araştırıcı tarafından *Cryptosporidium muris* adı ile hem cinsi hem de türünün tarifi yapılmıştır. Takiben 1912 yılında da *Cryptosporidium parvum* türü bildirilmiştir (1).

2.1. Sınıflandırma

Cryptosporidiosis'e yol açan türler, *Apicomplexa* kök altı, *Sporozoa* sınıfında, *Eucooccidiida* takımı, *Eimeriina* alt takımında, *Cryptospordiidae* ailesinde yer alan *Cryptosporidium* soyuna bağlı protozoonlardır (2). Şu ana kadar klasifiye edilmiş bazı önemli *Cryptosporidium* türlerinin sınıflandırılması Tablo 2.1'de gösterilmiştir (3).

Tablo 2.1. *Cryptosporidium*'un sınıflandırılması, bazı önemli türler ve bulunduğu konaklar

Sınıflandırma	**Konak**
Subphylum: Apicomplexa	
Class: Conoidasida Levine, 1988	
Subclass: Coccidiasina Leuckart, 1879	
Order: Eucoccidiorida Léger & Duboscq, 1910	
Suborder: Suborder Eimeriorina Léger, 1911	
Family: Cryptosporidiidae Léger, 1911	
Genus: Cryptosporidium Tyzzer, 1907	
Species: *C. parvum*	İnsan, Sığır
C. muris	Fare
C. andersoni	Sığır
C. baileyi	Tavuk
C.melaegridis	Hindi
C. serpentis	Yılan
C. nasorum	Balıklarda
C. ryanae	Sığırlarda
C. agni	Koyun
C. ameivae	Kertenkele
C. anserinum	Sığır

C. bovis	Sığır
C. crotali	Yılan
C. ctenosauris	Kertenkele
C. cuniculus	Tavşan
C. felis	Kedi
C. garnhami	İnsan
C. lampropeltis	Kertenkele
C. vulpis	Tilki
C. wrairi	Domuz
C. rhesi	Maymun
C. tyzzeri	Tavuk
C.hominis	İnsan

Doğum sonrası ishallere enteropatojenik viruslar ve bakterilerin sebep olmalarının yanı sıra *Cryptosporidium* türleri de sebep olmaktadır. Sığırlar en az 10 farklı *Cryptosporidium* türü ve genotipi ile enfekte olabilirler. Ancak, genellikle 4 *Cryptosporidium* türü hastalığı meydana getirmektedir (4). Bunlar *Cryptosporidium parvum, C. andersoni, C. bovis* ve *C. ryanae*'dir. Bu türlerden *C. andersoni* her yaştaki sığırlarda görülebilirken, *C. parvum* genellikle 2 aylıktan küçük buzağılarda, *C. bovis* ve *C. ryanae* ise 2-11 aylık buzağılarda enfeksiyona neden olmaktadır. *Cryptosporidium parvum*'un neden olduğu enfeksiyonlarda sulu ishal görülürken, diğer 3 türde klinik semptomlar çok nadir görülmekte veya hiç görülmemektedir (5, 6).

Son zamanlarda tür ayrımında polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) ve sekans analizleri gibi güvenilir teknikler uygulanmaya başlanmıştır. Yapılan moleküler çalışmalarla insan, sığır, kedi ve köpek türlerinin farklı genotipler olduğu ortaya konmuştur. 18S rRNA ve HSP70 geni üzerindeki araştırmalar *Cryptosporidium'*un 2 ana grup oluşturduğunu göstermektedir. *C. muris* ve *C. serpentis* bir grupta, *C. hominis, C. parvum, C. baileyi, C. felis, C. canis ve C. meleagridis* diğer grupta yer almaktadır. *Cryptosporidium parvum* ve *C. muris* memelilerde, *C. hominis* insanlarda yaygın olarak görülen türlerdir. Bunların yanı sıra *C. baileyi* ve *C. melaegridis* kanatlılarda, *C. serpentis* sürüngenlerde, *C. nasorum* balıklarda görülmektedir. Hem insanlarda hem de hayvanlarda gelişebilen tek tür *C. parvum*'dur. *C. parvum* ince bağırsağın distal bölümünde, *C. muris* ise abomasumda yerleşmektedir. Neonatal diareye sebep olan tür *C. parvum'*dur. *C. muris* çoğunlukla sütten kesilmiş buzağı ve erişkin sığırlarda bulunmakta ve yaygın olmayıp enfeksiyon hafif seyretmektedir. *C. parvum* Tip-1 ve Tip-2 olmak üzere 2 alt gruba ayrılır (7-10).

2.2. Hastalığın Epidemiyolojisi

Cryptosporidiosis, dünyanın hemen her yerinde (11) ve Türkiye'de yaygın olarak görülmektedir (12).

2.2.1. Cryptosporidiosis'in Türkiye'deki Yayılışı

Türkiye'de buzağılarda cryptosporidiosis olguları ilk olarak 1984 yılında bildirilmiştir (13). Daha sonra yapılan çalışmalarda cryptosporidiosis'in buzağı, kuzu ve oğlak gibi genç hayvanlarda ciddi sorunlara neden olduğu kaydedilmiş ve *Cryptosporidium* spp. oocystlerinin prevalansında sürü büyüklüğü, yetiştirme tipi, doğum zamanı ve sütten kesme gibi risk faktörlerinin etkili olduğu ileri sürülmüştür (14).

Cryptosporidium türlerinin Türkiye'de sığırlarda bulunma oranı konvansiyonel yöntemlerle araştırılmıştır. Buna göre hastalığın; Karacabey Harası sığırlarında bulunma oranı %26.7 (13), Elazığ'da %7.2 (15), Aydın'da %10.7 (16), Ankara'da %35.8 (17) ve %63.3 (18), Kars'ta %25.7 (19), %32.9 (12), Sivas'ta %4.5 (20) ve %70.3 (21), Hakkari'de %22.14 (22), Van'da %13.19 (23), Erzurum'da %22.8 (14) olarak bildirilmiştir. Konya yöresinde buzağılarda *Cryptosporidium* spp. oocystlerinin yaygınlığını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada ishalli buzağıların %63.92'sinde, ishal olmayan buzağıların ise %9.85'inde *Cryptosporidium* spp. oocystleri'ne rastlanmıştır (24). Akut ishalli buzağılar üzerine yapılan başka bir çalışmada ise bu oran %39.4 olarak belirlenmiştir (25).

Türkiye'de son yıllarda çok sınırlı da olsa cryptosporidiosis üzerine moleküler çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde, yine ishal tablosuna sahip olan 27 buzağı dışkısı Nested PCR ile incelenmiş, dışkıların 8'inde (%29.7) *Cryptosporidum* spp. pozitifliği saptanmıştır (26). Diğer bir çalışmada ise Ankara'da bulunan değişik sığırcılık işletmelerindeki 32 buzağıdan alınan toplam 130 dışkı örneği Nested PCR incelenmiş ve sonuç olarak buzağılarda %37.5 *Cryptosporidium* spp. pozitifliği belirlenmiştir (27).

C. parvum tip 1 ve tip 2 genotiplerinin spesifik real-time PCR ve PCR-RFLP teknikleri ile dünyanın farklı bölgelerinden insan ve buzağılardan elde edilmiş izolatlar ile deneysel laboratuar izolatlarında araştırıldığı bir çalışmada (28) Kars ilindeki buzağılardan elde edilmiş 15 izolatın her iki teknik ile de tip 2 genotipi olduğu ortaya konmuştur. *C. parvum*'un Kars'ta buzağılardan izole edilmiş 15 izolat ile İsrail'de yine buzağılardan izole edilmiş 61 izolatta multiple polymorphic genetik markerlar

kullanarak genotiplerinin araştırıldığı bir çalışmada (29), iki popülasyon sığır yetiştiriciliğinin parazit popülasyonun yapısı üzerine etkisi yönünden karşılaştırılmıştır. Kars yöresinde daha çok ticarete dayalı olarak çiftlikler arasında sık hayvan nakilleri olması parazit popülasyonlarının yayılmasına yol açtığı, böyle bir yapının İsrail'de ise bulunmadığı kaydedilmiştir. Çalışmada (29), her iki ülke için farklı multilocus genotiplerin bireysel olarak işletmelerde sınırlı kaldığı belirlenmiş, çiftlik başına düşen genotip ve miks izolat sayısının Türkiye'de daha yaygın olduğu saptanmıştır.

Öte yandan İzmirde toplam 707 çocuk üzerinde yürütülen diğer bir çalışmada (30), acid-fast ve phenol-auramine boyama yöntemleriyle toplam 4 dışkıda *Cryptosporidium* spp. pozitifliği belirlenmiş ve elde edilen bu izolatların PCR ve RFLP yöntemleriyle analizi sonucunda zoonotik *C. parvum* genotip 2'ye ait oldukları saptanmıştır. Aydın'da toplam 120 ishalli buzağıda PCR-RFLP sonucu *C. parvum* moleküler prevalansının %24,2 olduğu rapor edilmiştir (31).

Yakın zamanda Nevşehir yöresinde Real Time PCR ile incelemesi yapılan 150 buzağının %20,7'sinin cryptosporidiosis yönünden pozitif bulunduğu bir çalışmada (32), Real Time PCR tekniği ile pozitif belirlenen örneklerde *C. parvum* ve *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonlarının ayırıcı teşhisi yapılmış ve *C. parvum* prevalansı, %15,3, *Cryptosporidium* spp. prevalansı ise %5,3 olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada (32), araştırma yöresindeki primer yaygınlık gösteren türün *C. parvum* olduğu kaydedilmiştir. Real Time PCR ile yapılan bir diğer çalışmada (33) analiz sonucunda *C. parvum* ve *Cryptosporidium* sp. pozitifliği belirlenen örnekler, 18S rRNA gen bölgesi yönünden Nested PCR analizine tabii tutulmuş ve DNA bant profili ve konsantrasyonu uygun olan *C. parvum* için 6 ve *Cryptosporidium* sp. için ise 3 örneğin sekans analizleri ve GenBank kayıtları (JN245616-25) gerçekleştirilmiştir. Aynı çalışmada (33), moleküler filogenetik analizler sonucu, sekanslanan 3 *Cryptosporidium* sp. izolatının 2'sinin *C. ryanae*, 1'inin *C. bovis* olduğu ortaya konmuş ve Türkiye'den ilk bildirim olarak GenBank kayıtları yapılmıştır. Güven ve ark. (34) Erzurum yöresinde bir aydan küçük 307 buzağıda Nested PCR ile cryptosporidiosis prevalansını %3,9 olarak belirlemişler ve SSU rRNA gen bölgesi hedef alınarak yapılan DNA dizi analizleri sonuçlarına göre de PCR pozitif örneklerin *C. parvum* olduğunu saptamışlardır. Burdur ve yöresinde cryptosporidiosis yönünden TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizleriyle incelemesi yapılan sığırların %37,2'si pozitif bulunmuş, *C.*

parvum prevalansı ≤2 ay yaş grubunda %52,5, ≥6 ay yaş grubunda %3,8, toplamda ise %27,2; *Cryptosporidium* spp. prevalansı ≤2 ay grubunda %5,0, ≥6 ay yaş grubunda %14,6, toplamda ise %10,0 olarak saptanmıştır (35).

Türkiye'de şimdiye kadar sığırlarda *C. parvum* alt genotiplemesine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (35-37). Bu çalışmalardan, Yildirim ve ark. (36), Nevşehir yöresinde ishalli buzağılarda 6 *C. parvum* izolatının GP60 gen bölgesinin analizi sonucunda, 3'ünün IIaA13G2R1 ve diğer 3'ünün ise IIaA14G1R1 alt genotipine ait olduğunu kaydetmişlerdir. Arslan ve İtik Ekinci (37) ise Kars yöresinde 10 sığırda IIaA15G2R1, 2 sığırda IIaA16G3R1 ve 1 sığırda da IIdA15G1 alt genotiplerinin varlığını bildirmişlerdir. Burdur yöresinde sığırlarda *C. parvum* belirlenen toplam 10 izolatın (BCR-1-BCR-10) GP60 gen sekans analizleri sonucunda hepsinin IIaA13G2R1 alt genotip familyasında yer aldığı belirlenmiştir (35).

2.2.2. Cryptosporidiosis'in Dünyadaki Yayılışı

Dünya'da buzağılarda *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonları ile ilgili çalışmalara 1970'li yıllarda başlanmıştır (38). Sığırlarda tespit edilen *Cryptosporidium* türlerinin Dünya ülkelerinde yayılma oranı; İsrail'de %16,5 (39), Brezilya'da %63,6 (40), Meksika'da %25 (41), Japonya'da %23 (42), Fransa'da %17,9 (43), İspanya'da %47,9 (44), Norveç'te %12 (44), Hindistan'da %38,3 (45), Tayland'da %9,4 (46), Çek Cumhuriyeti'nde %25,8 (47), Tanzanya'da %19,7 (48), Kanada'da %30 (49), Amerika'da %2,4 (50) ve %3,2 (51), Nijerya'da %52,3 (52) ve Arjantin'de %19,35 (53) olarak bildirilmiştir. Bu durum, cryptosporidiosis'in dünyanın hemen her bölgesinde yüksek verim amacıyla yapılan sığırcılık için çok önemli bir problem olduğunu göstermektedir.

2.3. Hastalık Etkeninin Yaşam Döngüsü ve Çoğalması

Cryptosporidium türleri zorunlu, intrasellüler, monoksen parazitlerdir (54). Parazit, yaşam döngüsünü oocystlerin ağızdan alınması ile (konatamine su ve yemlerle), konağın mide ve bağırsak mukozası epitel hücrelerinin mikrovillus bölgelerinde tamamlamaktadır (44). Parazitin konak dışında geçirdiği tek evre oocyst evresi olup (55), enfekte konakta 6 evre görülmektedir (56).

2.3.1. Ekskistasyon

Enfekte konağın dışkısı ile serbest tabiata atılan oocystlerin ağız yolu ile alınması sonucu enfeksiyon bulaşmaktadır. Konağın sindirim kanalında oocystin parçalanmasıyla serbest kalan sporozoitler, apikal kompleks organelleri ile ince bağırsakta epitel hücrelerin mikrovilluslarına bağlanmakta (50) ve bunu izleyen gelişim evreleri "parazitofor vakuol" (ekstrasellüler, intrastoplazmik yerleşim) içerisinde geçmektedir (54,55).

2.3.2. Merogoni

Sporozoitler yuvarlaklaşarak trofozoit forma dönüşmekte ve takiben şizogonik bölünmeye maruz kalmaktadırlar. Trofozoit içindeki çekirdeğin bölünmesiyle 6-8 çekirdek ve bunların her birinden 6-8 merozoit oluşmaktadır. Bu merozoitleri taşıyan ana hücreye Tip I meront (şizont) adı verilmektedir. Tip I merontlardan oluşan merozoitler bu merontların zarını parçalamalarının ardından yeni konak hücreleri istila ederek Tip I ve II merontları oluşturmaktadırlar (54,55). Tip I merontlardan köken alan merozoitler, konakta yeni hücreleri enfekte ederek tekrar bir merogoni başlatmakta, tip II merontlar ise gametleri oluşturmaktadırlar (51).

2.3.3. Gametogoni

Tip II merontlardan oluşan merozoitler yeni konak hücreleri içine girerek mikrogamont veya makrogamontun oluştuğu eşeyli üremeyi (gametogoni) başlatmaktadır (51,55).

2.3.4. Fertilizasyon

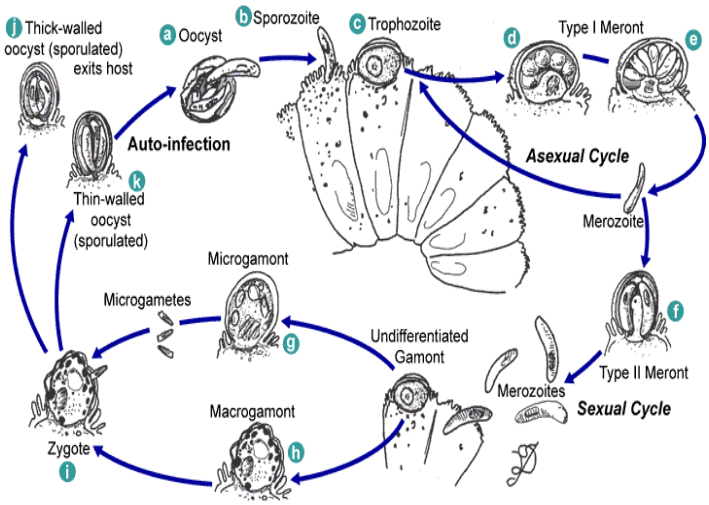
Yasam siklusunun dördüncü evresinde, bağırsak lümeninde serbest olarak bulunan 0,4-0,5 µm büyüklüğünde ve ince yapılı kamçısız mikrogametlerden birisinin, 4-6 µm büyüklüğündeki epitel hücrelere bağlı bulunan makrogameti döllemesi sonucunda zigot oluşmaktadır (55).

2.3.5. Oocyst duvar oluşumu

Döllenmiş makrogametlerden zigot oluşmaktadır (6,55). Bu dönemde zigotun etrafı iki veya üç farklı tabakanın birleşmesinden oluşan oocyst duvarıyla (%20'si ince, %80'i kalın) çevrili olup, zigotun etrafındaki duvarın kalınlaşması, parazitin bir konaktan diğerine bulaşmasını sağlayacak olan oocystleri oluşturmakta, (55) ince duvarlı oocystlerin ise otoenfeksiyonda rol aldıkları bildirilmektedir (56).

2.3.6. Sporogoni

Olgunlaşmamış oocystler, gelişmekte ve sporogonik bölünmeye maruz kalarak içlerinde enfeksiyon yapabilme yeteneği olan 4 sporozoit taşıyan olgun oocystler, oluşturmaktadırlar (57). Dışkı ile dış ortama atılan, içerisinde 4 sporozoit bulunan kalın duvarlı oocystlerin yeni bir konak tarafından sindirim yolu ile alınması sonucu yeni enfeksiyon şekillenmektedir. İnce duvarlı oocystler otoenfeksiyondan sorumlu olup, konak hücrenin parçalanmasıyla açığa çıkan ve oocyst duvarının inceliği dolayısıyla, oocyst bütünlüğü kolayca bozulan ve serbest kalan invazif karakterli sporozoitler, enterositlerin mikrovillus bölgelerine penetre olarak yeni bir enfeksiyon (otoenfeksiyon) siklusunu başlatmaktadırlar (44,54,55).



Şekil 2.1. *Cryptosporidium* türlerinin yaşam döngüsü (58)

2.4. Patojenite

Cryptosporidium enfeksiyonlarında genellikle ince bağırsağın distalinde, bağırsak mukozasında bozulmalar görülmektedir. Ancak enfeksiyon sonucu meydana gelen lezyonlar sekum, kolon ve duodenumda da saptanmıştır (59, 60). Bağırsak villuslarında, hastalığın seyrine göre, hafif veya orta şiddette genel atrofi ve füzyon gözlenmektedir. En belirgin histolojik görünümün fazla şiddetli olmayan bir kriptitisle karekterize enterokolitisin yanında mukoza kalınlığında azalma ve lamina propriada hücre birikimi gözlenmektedir. Buna bağlı olarak bağırsakların emilim yüzeylerinde azalma olmakta ve bağırsak mukozasının hiperemisiyle birlikte nötrofil granulositlerin infiltrasyonu görülmektedir (11,13).

Sığırlarda nadir görülen *C. muris* enfeksiyonlarında ise abomazum mukozasının kalınlaşması, bez lümenlerinin genişlemesi ve epitellerin atrofisi meydana gelmektedir (11).

2.5. Klinik Belirtiler

Cryptosporidiosis'in en önemli klinik semptomu, yeni doğanlarda ve immun sistemi baskılanmış sığırlarda görülen, pis kokulu, sarımtırak, yeşil renkli veya renksiz su kıvamında ishal olduğu, bazı dışkılarda mukus, fibrin, gaz kabarcığı ve kan izlerinin bulunduğu bildirilmekle birlikte, iştahsızlık, kas titremeleri, dengesiz yürüyüş, sıvı elektrolit kaybı, halsizlik, kilo kaybı, gelişme geriliği, beden ısısında hafif artış (maksimum 40,1°C) ve kıllarda karışıklık gibi belirtilerin cryptosporidiosis'de görülen diğer klinik semptomlardan olduğu belirtilmektedir. Cryptosporidiosis olgularında, oocyst çıkaran en genç buzağının 4 günlük olduğu (61); hastalığın, etkenin alınmasından 3 gün sonra şiddetli ishal ile kendini gösterdiği, 2-14 gün sürdüğü, ancak birçok olayda geçici iyileşme görülmesinden sonra da hastalığın tekrarlayabildiği bildirilmiştir (13). Özellikle enfeksiyona yakalanan 3 haftalıktan küçük buzağılarda mortalite oranı yüksek olup, enfeksiyon, bağışıklık sistemi gelişmiş ve erişkin hayvanlarda bir süre sonra kendiliğinden ortadan kaybolmaktadır. İmmun sistemi gelişmiş ve erişkin hayvanlar, hastalığa karşı dirençli olup genellikle subklinik enfeksiyon göstermekte ve rezervuar görevi üstlenmektedirler (2, 62).

Hastalık, çoğunlukla rotavirus, coronavirus, ETEC-K99 veya *Salmonella* gibi etkenlerle birlikte seyretmektedir. Cryptosporidiosis'in, normalde subklinik seyreden rotavirus enfeksiyonunu klinik baza taşıyabilme özelliği bulunmakta olup, asemptomatik rotavirus enfeksiyonları özellikle ince bağırsağın, üst jejunum bölgesine yerleşim göstermektedir. Fakat bu dönemde oluşabilecek bir cryptosporidiosis olgusu, distal ince bağırsak kısımlarını da tahrip etmektedir. Benzer şekilde kalın bağırsakları etkileyen coronavirus enfeksiyonu da ileum yıkımlanmasına bağlı olarak şiddetini arttırmaktadır. *C. parvum* ve *Salmonella* spp. ortak hastalık tablosuna ortalama 35 günlük olan buzağılarda rastlanmaktadır. Bunun yanında, özellikle kalın bağırsağa tutunan non-enterotoksijenik *E. coli, Schigella* spp. benzeri toksin üreterek dizanteriyi andıran bir tablo ortaya koymakta ve aynı bölgeye yerleşebilen *C. parvum* ile karşılıklı sinerjik bir ilişki kurabilmektedir. *Campylobacter* türlerinin buzağılar için çok önemli patojen

olarak görülmemesine rağmen, bu bakteriye ağır cryptosporidiosis olgusuna sahip buzağılarda sıklıkla rastlanılmaktadır (57,63,64).

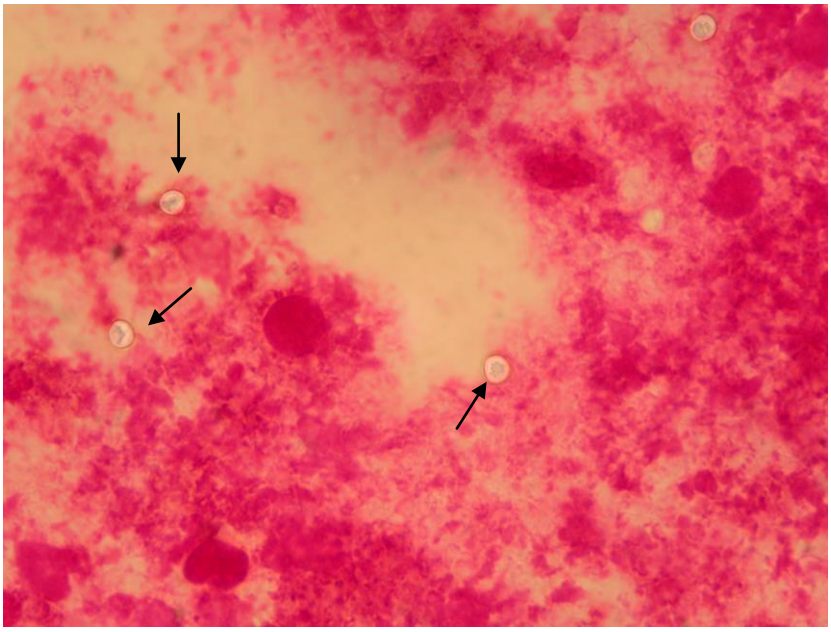
2.6. Hastalığın Tanısı

Yeni doğan buzağılarda ishal genellikle birçok patojenin birlikte oluşturduğu bir klinik semptom olduğundan dolayı, hastalığın tanısı için ayırıcı teşhise gidilmeli ve enfeksiyonun miks karakterde olup olmadığı ortaya konmalıdır. Bu nedenle, bakteriyolojik, virolojik ve parazitolojik yöntemler kullanılmalıdır. Virolojik ve bakteriyolojik teşhisler için gerekli kültür tekniklerinden yararlanılması gerekmektedir. Parazitolojik yönden ise, önemi özellikle son yıllarda anlaşılmış olan cryptosporidiosis'in tanısı; faz kontrast karanlık saha objektifli mikroskop ile var/yok için ön incelemeyi takiben boyama (dışkı boyama), enfekte dokuların biyopsisi, serolojik ve moleküler yöntemlerle yapılmaktadır (65).

Cryptosporidium türlerinin oocystleri çok küçük olup, normal dışkı muayenelerinde görülmeleri ve teşhis edilmeleri çok güç olduğundan dışkıdan hazırlanan preparatlara uygulanacak olan boyama ve zenginleştirme yöntemleri ile bu tür oocystlerin saptanmasında daha kolay ve hızlı sonuç alınması mümkün olabilmektedir. Bu amaçla kullanılan boyama metotları: Iodine boyama, Giemsa boyama, Tricrom boyama, Auramine-Rodamin boyama, Modifiye Soğuk Kinyoun boyama, Modifiye Kinyoun Asit Fast boyama, Modifiye Ziehl-Neelsen boyama, Acridine Orange boyama ve Modifiye Köster boyama olarak sıralanabilir (66,67). Ancak Modifiye Kinyoun asit-fast ve Modifiye Ziehl-Neelsen boyama yöntemleri, kolay uygulanabildikleri için daha sık olarak kullanılmaktadır (45). Hacim ve morfoloji olarak oocystlere benzemekte olan maya hücrelerinden kaynaklanabilecek yalancı pozitiflikten kaçınmak amacıyla belirtilen boyama metotlarından en güvenilir olanı Modifiye Ziehl-Neelsen boyama metodu olarak bildirilmiştir (68). Bununla birlikte yine de bu metotla *C. parvum* oocystlerinin, mantar sporları, yağ oluşumları ve bakteri sporları ile benzer şekilde görülmesi ile ayrımı güç olup bu boyamada *C. parvum* oocystlerine çok benzeyen diğer bir mikroorganizmanın da *Cyclospora cayetanensis* olduğu dikkate alınmalı, ancak morfolojik olarak *C. parvum* oocystlerinin *Cyclospora cayetanensis* oocystlerinden yaklaşık 2 katı büyüklükte olduğu unutulmamalıdır. *Cryptosporidium parvum* ve *C. muris* oocystlerinin Modifiye Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle hazırlanan preparatlarının mikroskobik muayenesinde morfolojik yapıları kısmen ayırt

edilebilmektedir. Buna göre *C. parvum* oocystleri, oval yapıda olup, 4.5x5.0 µm; *C. muris*'in oocystleri ise elips şeklinde olup 7.4x5.6 µm ölçülerinde olmasından dolayı bu yöntem ile teşhis edilebilmektedirler. Ancak mikroskobik muayenede tecrübeli kişilerin varlığına ihtiyaç duyulması ve boya almayan oocystler nedeniyle az sayıda oocyst içeren dışkılarda yanlış negatif sonuçların ortaya çıkması bu yöntemin dezavantajı olarak bilinmektedir. Dışkıda oocystlerin saptanması floresan veya enzim işaretli monoklonal antikorlar yardımıyla da serolojik teşhis mümkün olmakla birlikte, serolojik test sonuçları, çapraz reaksiyonlar dolayısıyla tartışmalı kabul edilmektedir.

Öte yandan ölen hayvanların nekropsisinde, bağırsaklardan hazırlanan Giemsa boyalı preparatlarda (ileum mukozasından hazırlanan sürme preparatları) ve Hematoksilen Eozin ile boyalı histolojik kesitlerde *Cryptosporidium* türlerinin gelişme şekilleri tespit edilmekte ve bu şekilde tanı konabilmektedir (11,69). Ayrıca histopatolojik doku preparatların moleküler yöntemlerle yapılan retrospektif incelenmesinde de cryptosporidiosis'i teşhis etmenin mümkün olduğu bildirilmektedir (70).



Şekil 2.2. Carbol fuchsin boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* oocystleri (35)

2.6.1. Moleküler Tanı Yöntemleri

Cryptosporidium türlerini klinik olgulardan, dışkı ile çok az miktarda oocyst atan rezervuar konaklardan ve çevresel kaynaklardan izole etmek amacıyla moleküler tanı yöntemleri son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmış (71,72), hatta teşhiste kalite ve kantiteyi arttırmaya yönelik olarak Real Time PCR, çeşitli spesifik gen

bölgelerini hedef alan Nested PCR gibi pek çok yeni moleküler teknikler geliştirilmiştir (72-75). Bunun yanında konvansiyonel boyama yöntemleriyle elde edilen pozitiflikler tür ve genotip düzeyinde identifikasyona olanak vermemektedir (76). Buna karşın moleküler olarak yapılabilen genotipleme sayesinde *Cryptosporidium* spp. pozitiflikleri filogenetik olarak karakterize edilebilmekte ve enfeksiyonun orijini ortaya konulabilmektedir. Bunun yanında moleküler karakterizasyon sayesinde *Cryptosporidium* türlerinin farklı suşları arasındaki genetik varyasyonların ortaya konması ile coğrafik bölgeler arasındaki ilişkiler de araştırılabilmektedir (77). Real-time PCR tekniği, hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle son yıllarda öne çıkan tekniklerin başında gelmektedir. Ayrıca söz konusu teknik ile mutasyon analizleri ve gen ekspresyonları da hassas bir şekilde belirlenebilmektedir. Son yıllarda cryptosporidiosis'in tür spesifik teşhisinde de kullanılmaya başlayan ribozomal ve mitokondriyal çeşitli gen bölgelerini hedef alarak spesifik primer ve problar ile araştırmaların yapıldığı dikkati çekmektedir (75,78). Real Time PCR tekniğinin sahip olduğu yüksek sensitivite ve spesifitenin yanında kantitafif analize olanak sağlaması, kontaminasyon riskinin çok daha düşük olması ve hızlı sonuç vermesi gibi çeşitli özellikleri ile konvansiyonel PCR, nested PCR ve antijen veya monoklonal antikor tabanlı ELISA gibi çeşitli tekniklere göre üstün bir teknik olarak kullanılmaya başlandığı ve bu konudaki çalışmaların devam ettiği görülmektedir (75,78,79). Bu proje önerisinde de söz konusu avantajları nedeniyle araştırma yöresinde sığırlarda cryptosporidiosis durumunu net olarak ortaya koyabilmek amacıyla *C. parvum* ve *Cryptosporidium* spp.'nin 18S rRNA (ribozomal RNA) gen bölgesi hedef alan spesifik primer ve problarla Real Time PCR tekniği araştırma yöntemi olarak seçilmiştir.

Cryptosporidium türleri ve genotiplerinin ortaya konmasında en çok kullanılan gen bölgelerinin başında small subunit ribosomal RNA (SSU-rRNA) geni gelmektedir. Oocyst Wall protein (COWP) encoding gen, 70 kDa heat shock protein (HSP70) gen ve actin genleri gibi diğer bazı gen bölgeleri söz konusu amaçla daha az kullanılmaktadır. Bunun yanında 60 kDa glycoprotein geni (GP60) *Cryptosporidium* genomunda polymorfik markerların başında gelmekte olup *C. parvum* ve *C. hominis* genotiplerinin ortaya konmasında esas rolü üstlenmektedir (80,81). *Cryptosporidium* tür ve genotiplerinin ayrımında kullanılan tekniklerden biri de PCR-RFLP tekniği olup SSU-rRNA gen bölgesinin Nested PCR ile amplifikasyonunu takiben elde edilen PCR

ürünleri konvansiyonel VspI, SspI ve MboII gibi restriksiyon enzimleri ile muamele edilmekte ve agaroz jeldeki DNA bant profillerine göre *C. parvum, C. andersoni, C. bovis* ve *C. ryanae* (*Cryptosporidium* deer-like genotype) ayrımı yapılabilmektedir (82, 83). Ancak kesin genotipleme ve filogenetik akrabalıkların ortaya konabilmesi ve farklı bant profilleri gösteren izolatların analizi için başta 18S rRNA gibi çeşitli gen bölgeleri sekanslanmakta ve moleküler filogenetik analizler gerçekleştirilmektedir.

2.7. İmmunite ve Antijenik Yapı

Cryptosporidiosis, daha çok bağırsak mikroflorasının gelişimini tamamlayamamış, spesifik ve nonspesifik immun sistem savunma gücü yetersiz olan genç konaklarda görülmektedir. Ancak hastalığın esas etkisi, genellikle immun sistemi baskılanmış konaklarda ortaya çıkmaktadır (65).

Cryptosporidiosis'de, doğal ya da kazanılmış bağışıklık söz konusudur. Non-lenfoid, Natural Killer (NK) ve Toll-like reseptör (TLR) hücrelerini kapsayan doğal bağışıklık, T hücre bağımsız immun yanıtları içermekte ve kısmi koruma sağlamaktadır. Epiteliyal hücrelerin *C. parvum* ile enfekte olması NF-$_K$ B'yi (yangı oluşturan faktör) aktif hale getirmektedir (84). IL_8, GRO-α ve RANTES gibi yangı öncesi şemokinlerin sentezi NF-$_K$ B'ye bağımlı olup, *C. parvum* ile enfekte hücrelerde bu moleküllerde artış gözlenmektedir. Söz konusu hücrelere NF-$_K$ B spesifik bir inhibitörün uygulanması, IL_8 'in sekresyonunu azaltmaktadır (84). Aynı zamanda katyonik antibiyotik peptitlerin üretimini uyarmakta ve sığırlarda β-defensin sentezini arttırmaktadır (85). NF-$_K$ B'nin başlangıç sitümilasyonu açık değildir. Fakat parazit ürünleri Toll-like reseptör molekülleri (TLR2 ve TLR4) ya da NOD-1 gibi hücre içi proteinlerle etkileşebilmektedir (86). Diğer yandan epiteliyal hücrelerin enfeksiyonu, prostoglandin üretimine de sebep olmaktadır. Prostoglandinler, koruyucu etkilere sahip olmanın yanında T hücre aktivasyonunu artırmakta ve yangıyı da azaltmaktadır. Ayrıca prostoglandinler ishal mekanizmasına da katkı sağlamaktadırlar (87).

Cryptosporidiosis'e karşı kazanılmış bağışıklıkta, maternal antikorlardan zengin kolostrumun ağızdan alınmasının önemli olduğu bilinmektedir. Kazanılmış bu bağışıklıkta, vücut savunmasının hücresel immuniteye dayandığı ifade edilse de, humoral immunitenin de rolü bulunmaktadır. Enfekte konaklarda, parazit spesifik antikorlar (IgM, IgG ve IgA) saptanmıştır (65).

Hücresel immunitede, splenik lenfositler *C. parvum* antijenleri ile inkube edildiğinde, $CD4^+$T hücreleri çoğalırken, $CD8^+$ T hücrelerinin çoğalamadığı saptanmıştır. Ayrıca $CD4^+$T hücrelerinin, hücresel ya da humoral yanıta aracılık edecek Th_1 ve Th_2 hücrelerine farklılaştığı bildirilmiştir (88). Th_1 sitokinleri, hücre fonksiyonlarının ve intestinal yapının bozulmasına yol açan yangıya aracılık etmeleri sonucu ortaya çıkan ishal ve *C. parvum* enfeksiyonlarının eliminasyonunda etkili olmalarından dolayı, cryptosporidiosis'in immunolojisinde önemli olmaktadır. Bu nedenle cryptosporidiosis için hücresel bazda temel rol $CD4^+$T lenfositlerine, T hücreleri ve diğer pek çok hücre tarafından üretilebilen IFN-ɣ ve interlökinlere ait olduğu bildirilmektedir (89,90).

2.8. Tedavi

Enfeksiyon teşhis edildikten sonra yapılacak olan ilk uygulama destekleyici tedavi şeklinde olmalıdır. Bu amaçla yoğun ishal sonucu meydana gelen dehidrasyonu önlemek amacıyla intravenöz yolla sıvı elektrolit tedavisi uygulanmaktadır.

Etiyolojik tedavide, halofuginon (günde 0,6 mg/kg p.o.x 7 gün), lasalocid (günde iki kez 6mg/kg p.o.x 3 gün) ve paromomycine (günde 100mg/kg p.o.x 11 gün) verilebilir. Fakat bu ilaçların da hastalığı ortadan kaldırmada spesifik etkiye sahip oldukları gösterilememiştir (91). Bununla birlikte söz konusu ilaçlar, enfeksiyonu hemen ortadan kaldırmasalar da ishalin şiddetini azaltarak iyileşmeğe katkı sağlamakta ve bu arada kazanılan zaman ile bağışıklık sistemi de kısmen gelişim göstermekte ve bu sayede hastalığın seyri olumlu yönde ilerlemektedir (92).

Ayrıca yapılan çalışmalarda enfekte buzağılara verilecek olan yemlere ilave edilen probiyotikler (*Lactobacillus ocidophilus, Streptococcus faecium* ve *Bacillus* spp.) ve prebiyotiklerin (Mannan oligosakkarit) hastalığın insidensini azalttığı da ileri sürülmektedir (93).

2.9. Korunma ve Kontrol

Cryptosporidiosis'den korunmada en önemli faktör, pasif bağışıklığı oluşturan kolostrumdur. Yeni doğan buzağılara maternal antikorlar anneden kan yolu ile aktarılamadığından maternal antikorlarla zengin kolostrum mutlaka ağızdan verilmesi önerilmektedir. Ağızdan alınan kolostral antikorlar, buzağıları enfeksiyon ajanı patojenlere karşı korumaktadırlar. Kolostral antikor alamayan buzağıların, alan buzağılara kıyasla 2-4 kat daha fazla ölüm ve hastalık riski taşıdıkları belirtilmiştir (94).

Doğumdan 16 saat sonra annenin antikorları reabsorbe etmesi ve aynı şekilde yavrunun da antikorları absorbe etme yeteneğinin azalması sonucu tam koruma sağlanamamaktadır (62). Bu sebepten dolayı yeni doğanların doğumdan hemen sonra mümkün olduğu kadar kısa sürede (en geç 12-24 saat) kolostrum alması gerekmektedir (95).

Cryptosporidium oocystleri çevre koşullarına oldukça dayanıklı olup, canlılıklarını uzun süre dış ortamlarda devam ettirmektedirler. *Cryptosporidium* enfeksiyonlarını kontrol altına almak için çevreden oocystlerin elimine edilmesi gerekmektedir. Oocystler çevre koşullarına ve dezenfeksiyona oldukça dirençlidirler. Ancak -20°C'de 72 saat dondurulmak veya 45-55°C'de 20 dakika ısıtılmak şartıyla enfekte etme potansiyelleri azaltılmakta ya da yok edilmektedir (96). Oocystlerin dezenfeksiyonunda en çok önerilen, %0.08'lik sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisidir. Ayrıca, Amonyak (NH_3)'ın %5'lik çözeltisinde ve +4°C'de 18 saatlik bir uygulama ile oocystlerin enfektivitesi tamamen yok olmaktadır (97). Öte yandan hayvanların barındığı ortama uygulanacak olan yüksek buhar basıncı (130 kg/cm^3) ile de dezenfeksiyon yapılabilmektedir.

Enfeksiyondan korunmada çiftlik yönetimi ve hijyen durumu da çok önemlidir. Doğum ortamı ve barınaklar temiz ve kuru olmalıdır. Yeni doğmuş buzağılar, hava akımının olmadığı, ancak yeterli havalandırmanın olduğu, her türlü stres faktörlerinden uzak yerlerde, ayrı padoklarda barındırılmalıdır. Yeni doğanların padoklarında kullanılan malzemeler sık sık temizlenmelidir. Öte yandan hastalar, ideal koşullarda tutulmalı ve bulaşmayı önlemek için diğer hayvanlardan izole halde barındırılmalıdır.

2.10. Hastalığa Bağlı Ekonomik Kayıplar

Cryptosporidiosis'in en karakteristik semptomu olan ishal, buzağılarda (özellikle neonatal buzağılarda); dehidrasyona, gelişme geriliğine ve ölüme neden olmaktadır. Buzağıların ishal kaynaklı bu problemlerini gidermek için uygulanması gereken, elektrolit solüsyonları, intravenöz sıvı tedavisi, ilaç takviyesi gibi tedavi giderleri hasta başına ortalama 55 dolar olarak hesaplanmıştır. Tedavi, emek gerektirmesi ve zaman alıcı olmasının yanında ekonomik yönden yem maliyetini de arttırmaktadır. Böyle bir hasta için bir aylık yem masrafı ortalama 60 dolar olarak hesaplanmıştır.

Cryptosporidium türleri yeni doğan buzağılarda bulunan en yaygın enteropatojenlerden olup, viral ve bakteriyel hastalıklarla miks seyirli enfeksiyonlarda daha da öldürücü

olmaktadırlar. Hasta buzağıların ölmesi ile birlikte ekonomik zararların daha çok artacağı muhakkaktır. Hastaların ölmeleri durumunda ortaya çıkacak ekonomik kayıplar, göre hesaplanmıştır. Buna göre 2012 yılı Ocak ayı itibarıyla Türkiye'de resmi rakamlara göre bu zarar; erkek buzağı için yaklaşık 1.000 dolar, dişi buzağı için yaklaşık 1.500 dolar olarak hesaplanmıştır (98). Ancak sığırın çok ekonomik bir hayvan olduğu ve yıllarca verimlilik sağlayacağı dikkate alındığında gelecek yıllardaki kayıpların da hesaplanması gerekir. Buna göre, erkek buzağı için ortalama 300 kg karkas etin kg fiyatı 8,5 dolar olduğuna göre toplam 2.550 dolar et kaybı olur. Bu kayıp, dişi buzağı için bir laktasyonda ortalama 4.000 lt süt x 5 laktasyon = 20.000 lt süt x sütün litre fiyatı (0,30 dolar) = 6.000 dolar'dır. Doğması gereken 5 yavru kaybı ise 1.500 dolar x 5 yavru = 7.500 dolar'dır. Bunların sonucunda ekonomik kayıp, bir erkek buzağı için yaklaşık 3.665 dolar ve bir dişi buzağı için 16.115 dolar olarak hesaplanır. Bu birim ekonomik kayıplar, Türkiye'de bir yılda karşılaşılan ortalama cryptosporidiosis insidensi dikkate alındığında, hastalığın Ülke ekonomisi için ne kadar büyük risk potansiyeli oluşturduğu kolayca anlaşılmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HAYVAN MATERYALİ VE KAN ÖRNEKLERİ

3.1.1. Araştırma Sahası ve Buzağıların Örneklenmesi

Çalışma 2011-2012 yılları arasında Konya merkez, ilçe ve köylerindeki 3 aylığa kadar ishalli buzağılardan tekniğine uygun olarak toplanmış toplam 194 dışkı örneği üzerinde yürütülmüştür. Örneklemeye alınan hayvanların örnekleme merkezi, yaş, cinsiyet ve ırka göre dağılımları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. 2012-2013 yılları arasında Konya yöresinde örneklenen buzağıların toplama merkezi yaş, ırk ve cinsiyete göre dağılımları

Araştırma Merkezi	Buzağı Sayısı								
	Yaş (gün)		Irk				Cinsiyet		Toplam
	≤15	>15	Simental	Holstein	Montofon	Yerli	Erkek	Dişi	
Merkez	89	20	23	57	7	22	52	57	109
Karatay	27	8	4	25	4	2	20	15	35
Selçuklu	42	8	7	28	4	11	23	27	50
Toplam	158	36	34	110	15	35	95	99	194

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1. Modifiye-Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemiyle Dışkı Muayenesi

Buzağılardan alınan dışkı örneklerinden hazırlanan ince yayma paratlar kurutulduktan sonra Modifiye-Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile boyanmış ve önce 10X40'lık, sonra da 10X100'lık büyütme ile incelenerek *Cryptosporidium* sp. oocystleri yönünden incelenmiştir (99).

3.2.2. Genomik DNA Ekstraksiyonu

-20ºC'de muhafaza edilen dışkı örnekleri ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözünmeye bırakılmış ve çözünen örneklerden ön homojenizasyon sonrası genomik DNA ekstraksiyonu, tam otomatik DNA/RNA ekstraksiyon cihazında (Bioneer ExiprepTM 16) gerçekleştirilmiştir. Final elüsyon 50µl olacak şekilde ayarlanmıştır.

Elde edilen genomik DNA konsantrasyonları moleküler analizlerde optimum DNA konsantrasyonunun ayarlanabilmesi için Nanodrop spektrofotometre (ACT Gene ASP-3700) kullanılarak ölçülmüştür. Genomik DNA ekstraktları kullanılana dek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Elde edilen genomik DNA ekstraktları *C. parvum* tür spesifik polimorfik fakat işlevi bilinmeyen (100; GenBank Aksesyon numarası: AF190627) ve *Cryptosporidium* soy spesifik 18S rRNA (ribozomal RNA) gen bölgelerini hedef alan spesifik primer ve TaqMan problar kullanılarak Real Time PCR'da analiz edilmiştir. Bu amaçla kullanılan primer ve TaqMan probları Tablo 3.2'de verilmiştir (75). Bu tekniğin uygulanması ile örneklerde *C. parvum* ve *Cryptosporidium* sp. varlığı eş zamanlı olarak incelenmiştir.

Tablo 3.2. *C. parvum* ve *Cryptosporidium* sp. için Real Time PCR'da kullanılan primer ve TaqMan problar

Primer Adı	**Primer Dizilimi (5'---3')**	**TM* (^{o}C)**
Cryptosporidium sp.		
JVAF	ATGACGGGTAACGGGGAAT	56,7
JVAR	CCAATTACAAAACCAAAAAGTCC	55,3
JVAP18S	Cy3-CGCGCCTGCTGCCTTCCTTAGATG-BHQ2	67,8
C. parvum		
JVAGF	ACTTTTTGTTTGTTTTACGCCG	54,7
JVAGR	AATGTGGTAGTTGCGGTTGAA	55,9
JVAGP	FAM-ATTTATCTCTTCGTAGCGGCG-BHQ1	57,9

*TM: Melting Temperature

Real Time PCR testinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının kontrolü amacıyla her qPCR analizinde pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuarında mevcut olan çeşitli *Cryptosporidium* izolatları (*C. parvum, C. bovis, C. ryanae),* negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Real Time PCR analizleri Stratagene Mx 3005P (Stratagene, Agilent Technologies, USA) cihazında

gerçekleştirilmiştir. PCR, master mix üreticinin açıklamalarına göre toplam 20 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies)	10,0 µl
JVAF (10 pmol)	1,0 µl
JVAR (10 pmol)	1,0 µl
JVAP18S (10 pmol)	1,0 µl
JVAGF(10 pmol)	1,0 µl
JVAGR(10 pmol)	1,0 µl
JVAGP2(10 pmol)	1,0 µl
Genomik DNA (50 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	3,0 µl

Real Time PCR amplifikasyonu için termal profil 95 ºC 2dk 1 siklus ve 45 siklus 94 ºC 10sn, 55 ºC 30s, 72 ºC 20s olarak ayarlanmıştır (Jothikumar ve ark., 2008). Real Time PCR analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler ve kantitatif değerler, amplifikasyon eğrileri ve Ct (dR) (Eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

3.2.4. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Genomik DNA ekstraksiyonu yapılan tüm örnekler ayrıca *Cryptosporidium* small subunit (SSU) rRNA geninin yaklaşık 834 bp parsiyel kısmını amplifiye eden spesifik primerlerle Nested-PCR analizine tabii tutulmuştur. Nested PCR analizinin ilk PCR basamağında [5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'] forward ve (5'-CCCATTTCCT TCGAAACAGGA-3') reverse primerleri, ikinci PCR basamağında ise [5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'] forward ve [5'-AAGGAGTAAGGAA CAACCTCCA-3'] reverse primerleri kullanılmıştır (81,82). Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 50 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, [6 mM $MgCl_2$ 1. PCR; 3mM $MgCl_2$ 2. PCR], 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase olarak hazırlanmıştır. 1. PCR reaksiyonu için 50 ng/µl template DNA, 2. PCR reaksiyonu için ise ilk reaksiyon sonucu elde edilen amplikondan 2 µl kullanılmıştır. Thermalcyclerda protokol her iki

PCR için de initial denaturation: 94 ℃'de 3 dk; 35 siklus, denaturation: 94℃'de 45 s, annealing: 55℃'de 45 s, extension: 72℃'de 1 dk; final extension: 72 ℃'de 7 dk olacak şekilde programlanmıştır. Nested PCR geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuarında mevcut olan çeşitli *Cryptosporidium* izolatları (*C. parvum, C. bovis, C. ryanae),* negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektoforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

Pozitif belirlenen sığırlarda *Cryptosporidium* tür ve genotiplemesi ile aynı zamanda miks enfeksiyonların belirlenebilmesi amacıyla Nested PCR sonrası elde edilen amplikonlardan 10 µl alınıp 30 µl total hacimde VspI (FastDigest Thermo Scientific), SspI (FastDigest SspI, Thermo Scientific) ve MboII (FastDigest MboII, Thermo Scientific) restriksiyon enzimleri ile üreticinin açıklamalarına göre 37℃'de 10 dk reaksiyona tabii tutulmuş, daha sonra karışım 65 °C'de 5 dk tutularak enzimler inaktif hale getirilmiştir. Elde edilen ürünler (10 µl) % 1,5'lik agaroz jelde elektoforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip bant profilleri yönünden analiz edilmiştir (81-83). Her bir örnek için PCR-RFLP tekniği kontrol açısından iki kez çalışılmıştır.

3.2.5. Sekans ve Filogenetik Analizler

3.2.5.1. *Cryptosporidium* Small Subunit (SSU) rRNA Geninin Sekansı ve Filogenetik Analizi

Real Time PCR ve PCR-RFLP sonuçlarının konfirmasyonu için uygun konsantrasyonda belirlenen bazı izolatların SSU-rRNA parsiyel gen bölgesi Nested PCR ile amplifiye edilmiştir. Nested PCR analizinin ilk PCR basamağında 18SiCF2 (5'- GAC ATA TCA TTC AAG TTT CTG ACC-3') ve 18SiCR2 (5'-CTG AAG GAG TAA GGA ACA ACC- 3') primerleri, ikinci PCR basamağında ise 18SiCF1 (5'- CCT ATC AGC TTT AGA CGG TAG G- 3') ve 18 SiCR1 (5'- TCT AAG AAT TTC ACC TCT GAC TG-3') primerleri kullanılmıştır (101). Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 1 X PCR buffer, 1,5 mM

MgCl2, 12,5 pmol her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 0,5U Taq DNA polymerase olarak hazırlanmıştır. 1. PCR reaksiyonu için 50 ng/µl template DNA, 2. PCR reaksiyonu için ise ilk reaksiyon sonucu elde edilen amplikondan 1 µl kullanılmıştır. Thermalcyclerda protokol her iki PCR için de initial denaturation: 94 ℃'de 5 dk; 45 siklus, denaturation: 94℃'de 30s, annealing: 58℃'de 30s, extension: 72℃'de 30sn; final extension: 72 ℃'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (101). Nested PCR analizlerinde herhangi bir kontaminasyonun meydana gelip gelmediğini belirlemek amacı ile steril deiyonize su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektoforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

Nested PCR sonucu jel üzerinde belirlenen amplikonlar, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonrası örnekler SSU-rRNA parsiyel gen bölgesinin analizi için 18SiCR1 ve 18SiCF1 primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlara ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra BioEdit Sequence Alignment (102) ve Geneious 5.5.5 (103) yazılımları ile forward ve revers dizilimlerin pairwise alignmentları yapılmış final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) analizleri yapıldıktan sonra Dünyada GenBank'a kayıtlı diğer benzer izolatlar ile Mega 5.0 (104) ve Geneious 5.5.5 (103) yazılımlarında multiple alignmentları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur. Elde edilen tüm dizilimlerin GenBank kayıtları yapılmıştır.

3.2.5.2. *C. parvum* 60 kDa glycoprotein (GP60) Geninin Sekansı ve Filogenetik Analizi

Real Time PCR'da *C. parvum* olarak belirlenen ve PCR-RFLP tekniği ile miks enfeksiyon olmadığı ortaya konan uygun konsantrasyondaki toplam 10 izolatın alt genotiplerinin ortaya konması için 60 kDa glycoprotein geninin (GP60) yaklaşık 850 bp parsiyel kısmını amplifiye eden spesifik primerlerle Nested-PCR analizi yapılmıştır. Nested PCR analizinin ilk PCR basamağında AL3531 (5'-ATAGTCTC CGCTGTATTC-3') forward ve AL3535 (5'-GGAAGGAACGATGTATCT-3') reverse primerleri, ikinci PCR basamağında ise AL3532 (5'-TCCGCTGTATTCT CAGCC-3')

forward ve AL3534 (5'-GCAGAGGAACCAGCATC-3') reverse primerleri kullanılmıştır (105). Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 50 µl final konsantrasyonda, 1X PCR buffer, 3mM $MgCl_2$, 200 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 5U Taq DNA polymerase olacak şekilde hazırlanmıştır. 1. PCR reaksiyonu için 50 ng/µl template DNA, 2. PCR reaksiyonu için ise ilk reaksiyon sonucu elde edilen amplikondan 2 µl kullanılmıştır. Thermalcyclerda protokol her iki PCR için de initial denaturation: 95 ˚C'de 3 dk; 35 siklus, denaturation: 94˚C'de 45 s, annealing: 50 ˚C'de 45 s, extension: 72˚C'de 1 dk; final extension: 72 ˚C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (106). Nested PCR geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuarında mevcut olan çeşitli *C. parvum* izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5'luk agaroz jelde elektoforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir. Nested PCR'ın 2. basamağında elde edilen amplikonların 60 kDa glycoprotein gen (GP60) bölgesi jel pürifiye edildikten sonra AL3532 ve AL3534 primerleri ile çift yönlü olarak sekanlanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlara ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra BioEdit Sequence Alignment (102) ve Geneious 5.5.5 (103) yazılımları ile forward ve revers dizilimlerin pairwise alignmentları yapılmış, final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) analizleri yapıldıktan sonra Dünyada GenBank'a kayıtlı diğer benzer izolatlar ile Mega 5.0 (104) ve Geneious 5.5.5 (103) yazılımlarında multiple alignmentları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ile alt genotipleri ortaya konmuştur. Elde edilen tüm dizilimlerin GenBank kayıtları yapılmıştır.

3.3. İstatistiksel Analiz

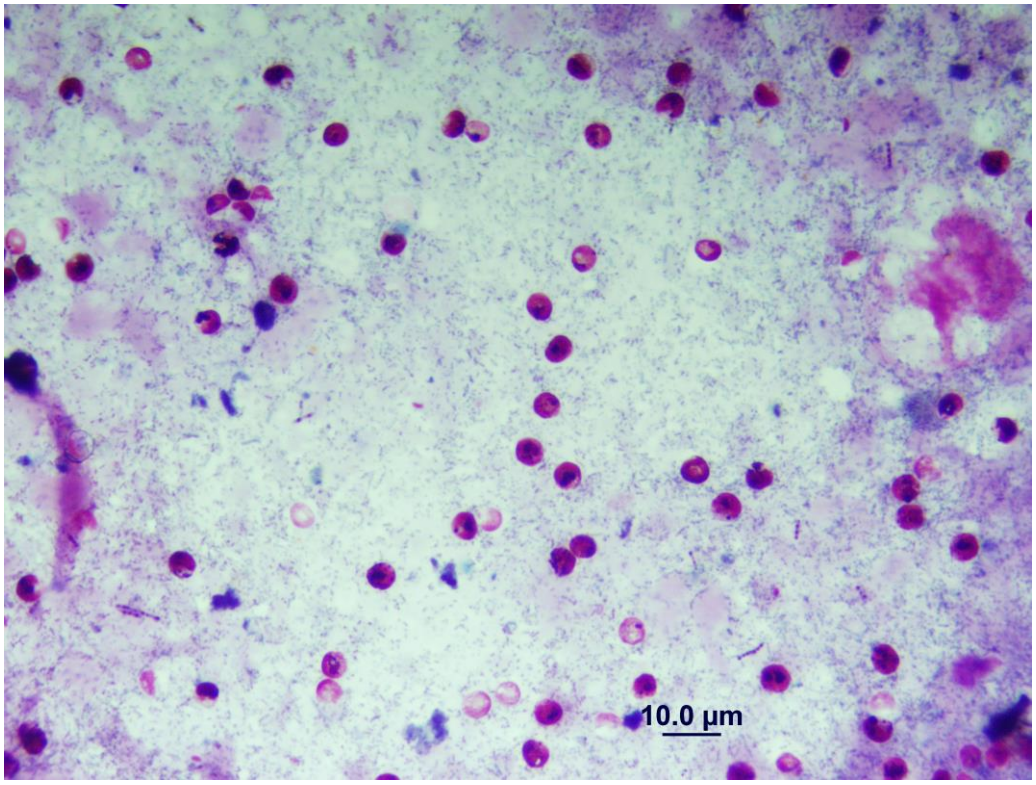
İstatistik açıdan incelenen buzağılarda cryptosporidiosis prevalansı ile yaş, cinsiyet ve ırk faktörlerinin ilişkisi, Fisher's Exact ve Pearson's Chi Square testleriyle araştırılmıştır. *C. parvum* pozitif örneklerde DNA yoğunluğunu dolayısyla parazitemiyi gösteren eşik değer sikluslarıyla (Ct(dR)) yaş ve cinsiyet faktörlerinin ilişkisi Independent Samples T testi, ırk faktörünün ilişkisi ise One-Way Anova testiyle araştırılmıştır. Sığırda cryptosporidiosis'in teşhisinde kullanılan yöntemlerin istatistiksel

olarak sensitivite ve spesifiteleri ilgili referansa göre belirlenmiştir (107). Testler arasındaki uyumun belirlenmesinde Kappa testi kullanılmıştır. İstatistik hesaplamalar SPSS 15.0 programı kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Modifiye-Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemiyle Dışkı Muayenesi Sonuçları

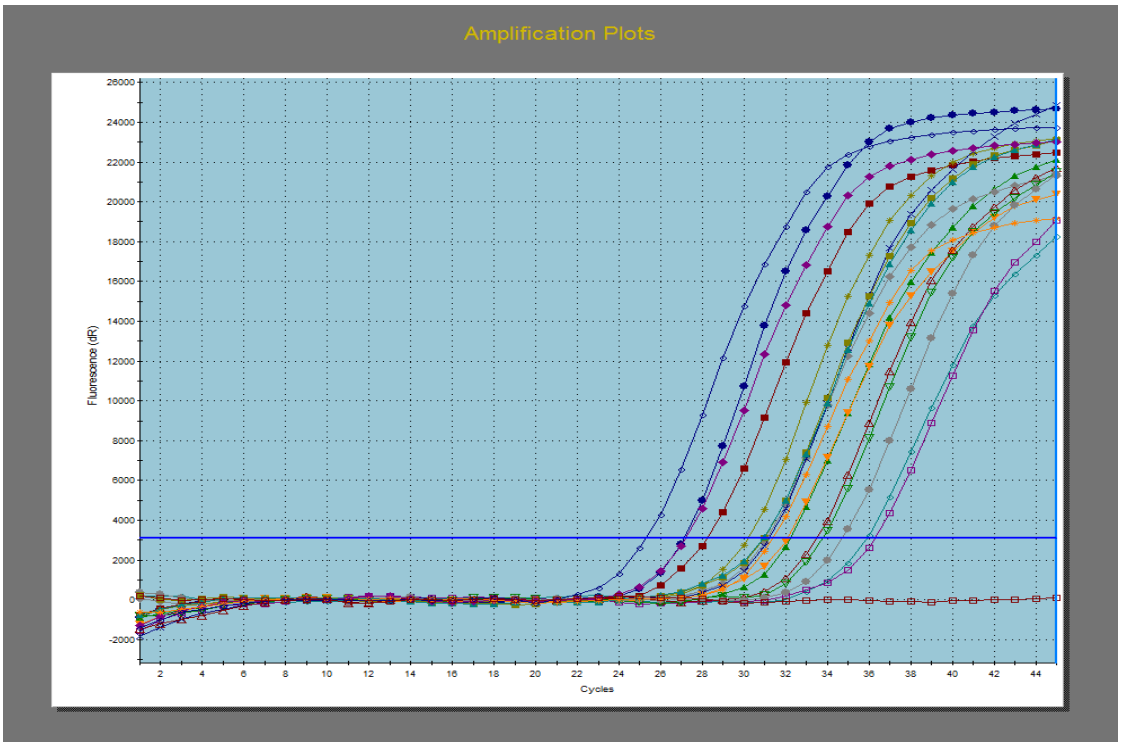
Modifiye-Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle incelenen 194 dışkı örneğinden 92'si (%47,4) *Cryptosporidium* oocystleri yönünden pozitif (Şekil 1) değerlendirilmiştir. Dışkı muayenesinde oocyst yoğunluğuna göre 1+ ve 5+ arasında skorlandırılmış olan pozitif örneklerin araştırma merkezlerine göre dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.



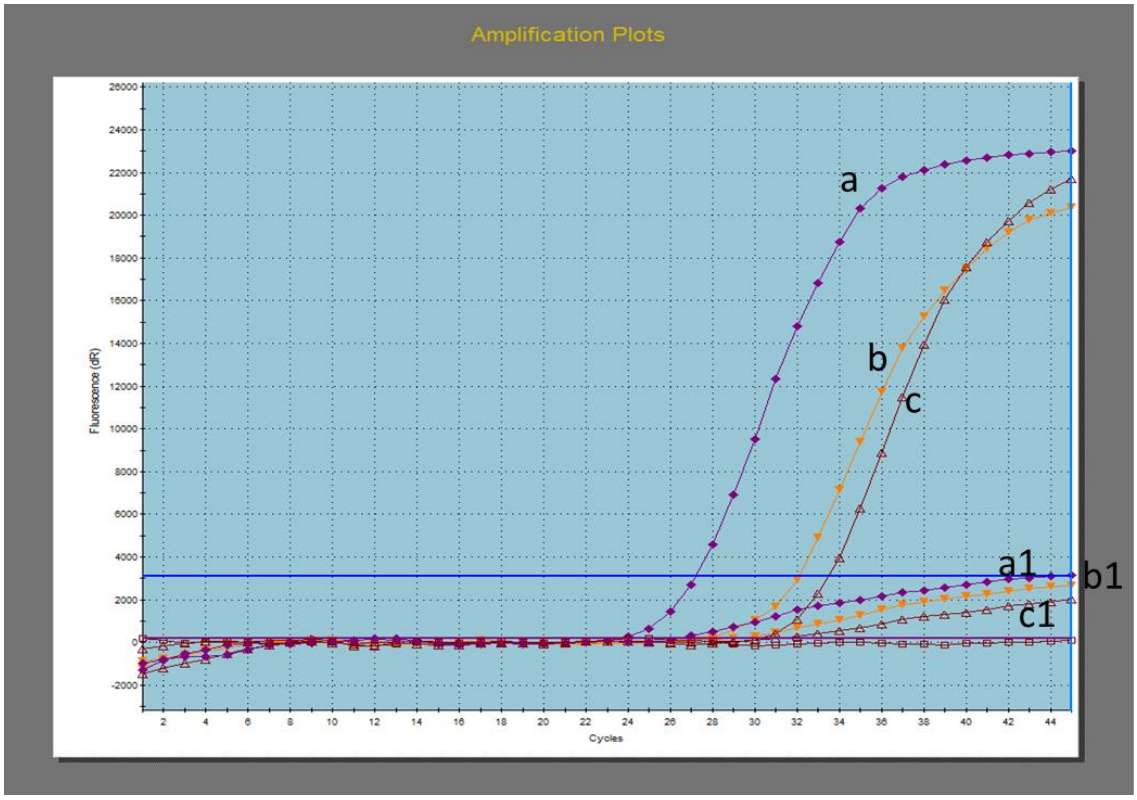
Şekil 4.1. Modifiye-Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle *Cryptosporidium* sp. olarak değerlendirilen oocystler

4.2. Real Time PCR Sonuçları

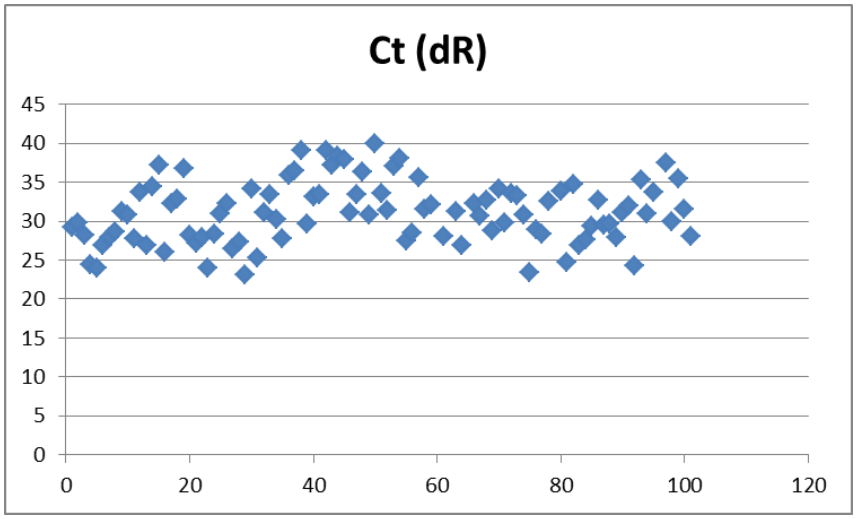
İncelemesi yapılan toplam 194 buzağıdan 104'ü (%53,6) Real Time PCR analizleriyle cryptosporidiosis yönünden pozitif bulunmuştur (Tablo 1). Pozitif belirlenen örneklerin tümünde *C. parvum* belirlenmiş, yalnızca *Cryptosporidium* sp. pozitifliği saptanmamıştır. *C. parvum* pozitif belirlenen bazı örneklerin TaqMan prob tabanlı Real Time PCR'da polimorfik bir gen bölgesini amplifiye eden spesifik primer ve problarla analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrisi Şekil 4.2-4.3'de verilmiştir. *C. parvum* için saptanan Ct (dR) (Eşik değer siklusu) değerleri de Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. TaqMan Real Time PCR analizleri sonucu *C. parvum* pozitif saptanan örneklerin amplifikasyon grafikleri



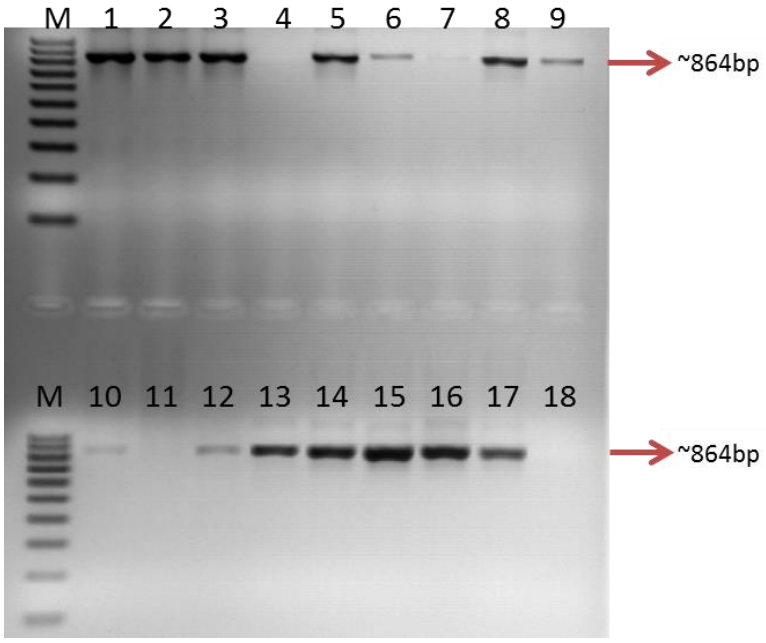
Şekil 4.3. *C. parvum* pozitif saptanan örneklerin duplex TaqMan Real Time PCR da amplifikasyon grafikleri a,b: *C. parvum*, a^1,b^1: *Cryptosporidium* spp.



Şekil 4.4 Real Time PCR'da *C.parvum* pozitif saptanan örneklerin Ct (dR) değerlerine göre dağılımı

4.3. SSU rRNA Nested PCR Sonuçları

SSU rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu yönünden Nested PCR analizleriyle toplam 194 buzağıdan 84'ü (%43,3) Real Time PCR analizleriyle cryptosporidiosis yönünden pozitif bulunmuştur. İncelenen örneklerde Nested PCR sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Bazı pozitif izolatlarda parsiyel SSU rRNA gen bölgesinin nested PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonların %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. *Cryptosporidium* türlerinin parsiyel SSU rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); 17: Pozitif kontrol; 18: No DNA

Tablo 4.1. İncelenen hayvanlarda mikroskobik, Nested PCR ve Real Time PCR analiz sonuçları

Araştırma Merkezi	İncelenen Buzağı Sayısı	Mikroskopi					Real Time PCR		Nested PCR
		1+	2+	3+	4+	5+	C. parvum	Yalnız Cryp sp.	
Merkez	109	14	16	7	12	5	56	0	48
Karatay	35	8	3	4	1	0	19	0	16
Selçuklu	50	10	2	4	5	1	29	0	20
Toplam	194	32	21	15	18	6	104	0	84

4.4. Cryptosporidiosis'in Teşhisinde Kullanılan Yöntemlerin Kıyaslanması

Cryptosporidiosis yönünden Modifiye-Ziehl-Neelsen boyama ve Nested PCR sonuçlarının Real Time PCR sonuçları ile karşılaştırmalı analizleri Tablo 4.2'de verilmiştir. Tablo 4.2'de görüldüğü üzere mikroskobi pozitif 92 örneğin TaqMan Real Time PCR analizleriyle 78'i *C. parvum* pozitif, 14'ü ise negatif olarak belirlenmiştir. Moleküler olarak negatif saptanan bu 14 örneğin dışkı bakısı skorlarında 10'un 1+, 4'ünün ise 2+ kategorisinde yer aldığı görülmüştür. Mikroskobi negatif 102 örneğin ise TaqMan Real Time PCR analizleriyle 27'i *C. parvum* pozitif ve 75'i de negatif olarak saptanmıştır. Mikroskobik teşhisin Real Time PCR tekniği ile kıyaslanması sonucu %75,0 sensitivite ve %84,4 spesifite gösterdiği belirlenmiştir. Kappa testi ile Real Time PCR ve mikroskobik teşhis arasında %58,9 ($p<0,01$) uyum saptanmıştır.

Nested PCR pozitif 84 örneğin TaqMan Real Time PCR analizleriyle tümü *C. parvum* pozitif olarak saptanmıştır. Nested PCR negatif 110 örneğin ise TaqMan Real Time PCR analizleriyle 20'si *C. parvum* pozitif ve 90'ı da negatif olarak saptanmıştır. Nested PCR'ın Real Time PCR tekniği ile kıyaslanması sonucu %80,8 sensitivite ve %100,0 spesifite gösterdiği belirlenmiştir. Kappa testi ile Real Time PCR ve Nested PCR tetsleri arasında %79,6 ($p<0,01$) uyum saptanmıştır.

Tablo 4.2. İncelenen hayvanlarda mikroskobik, Nested PCR ve Real Time PCR analiz sonuçlarının karşılaştırılması

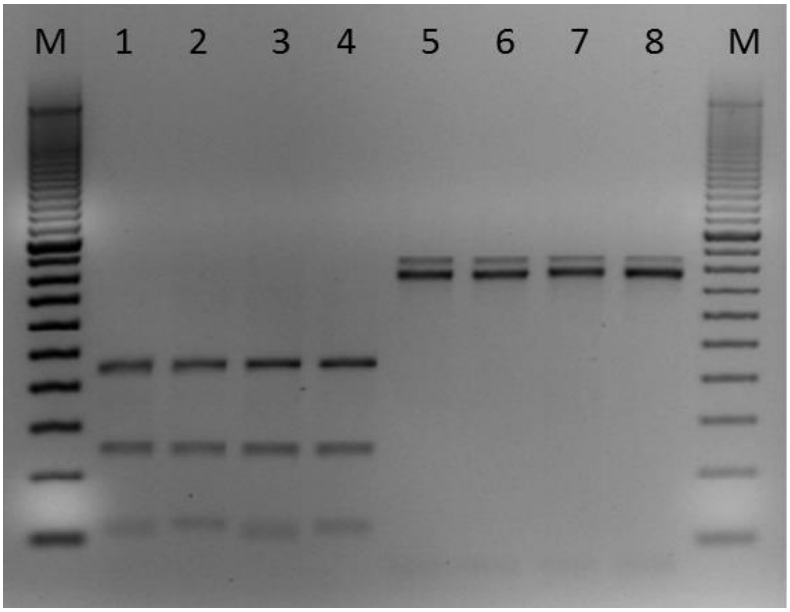
		Real Time PCR			Sensitivite (%95 güven aralığı)	Spesifite (%95 güven aralığı)
		+	-	Toplam		
Mikroskobi	+	78	14	92	0,750 (0,659-0,823)	0,844 (0,756-0,905)
	-	26	76	102		
	Toplam	104	90	194		
Nested PCR	+	84	0	84	0,808 (0,722-0,872)	1,000 (0,959-1,000)
	-	20	90	110		
	Toplam	104	90	194		

4.5. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ile *Cryptosporidium* İzolatlarının Genotiplendirilmesi

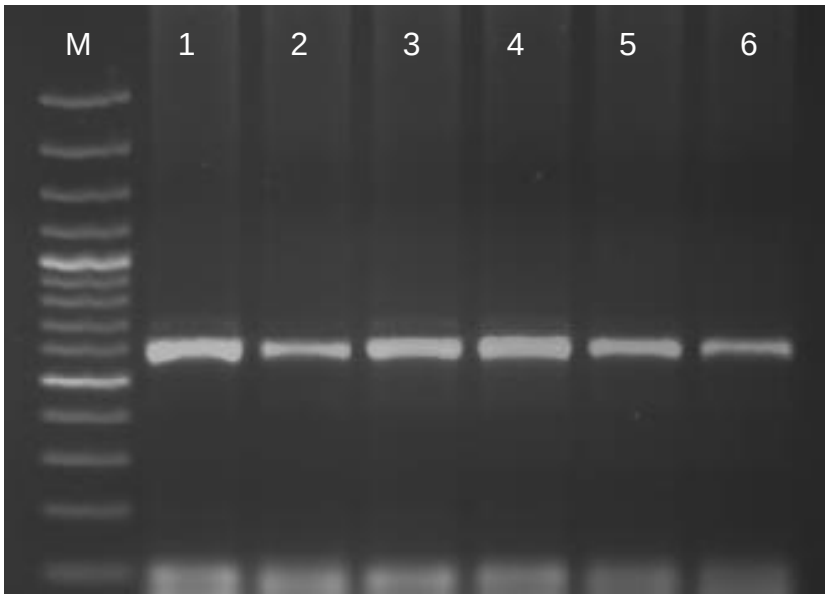
Real Time PCR analizlerinde *C. parvum* olarak belirlenen ve SSU rRNA gen bölgesinin nested PCR ile analizleri sonucunda jel üzerinde amplifikasyon gösteren toplam 84 izolatın VspI, SspI ve MboII restriksiyon enzimleri ile RFLP analizleri sonucunda hepsinin *C. parvum*'a identik bant profillleri gösterdiği saptanmıştır. İncelenen pozitif örneklerde VspI, SspI ve MboII restriksiyon enzimleri ile RFLP sonrası belirlenen bant profilleri Tablo 4.3'de verilmiştir. Bazı *C. parvum,* izolatlarının SspI/MboII ve VspI restriksiyon enzimleri ile RFLP analizleri sonucu belirlenen bant profillerinin %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri ise sırasıyla Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir. İncelenen örneklerde RFLP analizleri sonucu diğer türlerle miks enfeksiyonlara rastlanmamıştır.

Tablo 4.3. Pozitif örneklerde SspI ve MboII restriksiyon enzimleri ile RFLP sonrası belirlenen bant profilleri

***Cryptosporidium* türü**	***n***	**SspI (bp)**	**MboII (bp)**	**VspI (bp)**
C. parvum	84	449, 267, 108	832, 771, 76	628, 115, 104



Şekil 4.6. Bazı *C. parvum* pozitif izolatlarda parsiyel SSU rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası elde edilen ürünlerin SspI (1-4) ve MboII (5-8) restriksiyon enzimleri ile RFLP analizleri sonucu belirlenen bant profillerinin jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp)



Şekil 4.7. Bazı *C. parvum* pozitif izolatlarda (1-6) parsiyel SSU rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası elde edilen ürünlerin VspI restriksiyon enzimi ile RFLP analizleri sonucu belirlenen bant profillerinin jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp)

4.6. Cryptosporidiosis'in Moleküler Prevalansında Bazı Epidemiyolojik Faktörlerin Analizi

C. parvum yönünden pozitif belirlenen örneklerin buzağıların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımları ve istatistiksel verileri Tablo 4.4'de verilmiştir. Tablo 4.4'de görüldüğü üzere sığırların yaş gruplarına göre *C. parvum* prevalansının ≤15 gün grubunda >15 gün grubuna grubuna göre yüksek belirlenmesine karşın bu farklılık istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur (p>0,05). Cinsiyete ve ırka bağlı olarak *Cryptosporidium* türlerinin dağılımları arasında istatistiksel bir önem görülmemiştir (p>0,05).

Tablo 4.4. Buzağılarda cryptosporidiosis prevalansının *Cryptosporidium* türlerine göre yaş, cinsiyet ve ırkla ilişkisi

Faktör	İncelenen sığır sayısı	Enfektif sığır		χ^2	P
		Sayısı	%		
Yaş grupları (gün)					
≤15	158	89	56,3	2,535*	0,139
>15	36	15	41,7		
Cinsiyet					
Erkek	95	54	56,8	0,783*	0,391
Dişi	99	50	50,5		
Irk					

Simental	34	22	64,7[a]	11,431	0,010
Holstein	110	64	58,2[a]		
Montofon	15	8	53,3[a]		
Yerli	35	10	28,6[b]		
Toplam	194	104	53,6		

χ^2: Pearson Chi-Square, Fisher
*: Fisher's Exact Test
[a,b]: Grupların *Cryptosporidium* türüne göre istatistiksel verileri

C. parvum pozitif belirlenen örneklerde saptanan Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımı Tablo 4.5'de verilmiştir. Ct (dR) değerlerine göre yaş, cinsiyet ve ırk gruplarına göre istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır (p>0,05).

Tablo 4.5. *C. parvum* pozitif belirlenen örneklerde saptanan Ct (dR) değerelerinin sığırların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımı

Faktör	Ct (dR)			t	P
	Ort	Min-Max	Standart Sapma		
Yaş grupları (gün)					
≤15	30,90	23,06-39,12	4,03	-0,186	0,205
>15	32,26	27,78-40,00	3,49		
Cinsiyet					
Erkek	31,58	23,47-40,00	4,18	-0,182	0,240
Dişi	30,62	23,06-39,12	3,73		
Irk				F	P
Simental	32,08	24,44-38,33	4,10	0,0823	0,485
Holstein	30,77	23,06-39,12	3,80		
Montofon	30,09	26,90-39,02	4,41		
Yerli	31,79	24,66-40,00	4,46		

t: Independent Samples T Test
F: One-Way Anova

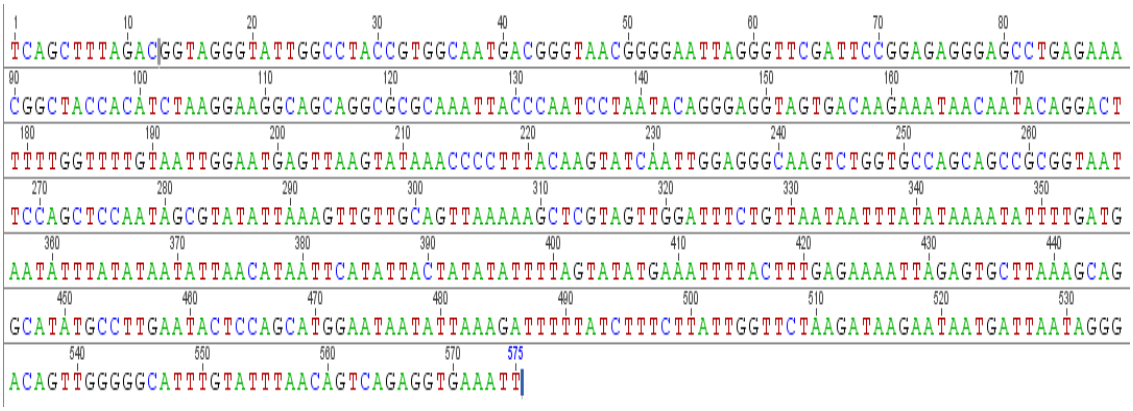
4.7. Sekans ve Filogenetik Analizler

4.7.1. *Cryptosporidium* Small Subunit (SSU) rRNA Geninin Sekansı ve Filogenetik Analizi

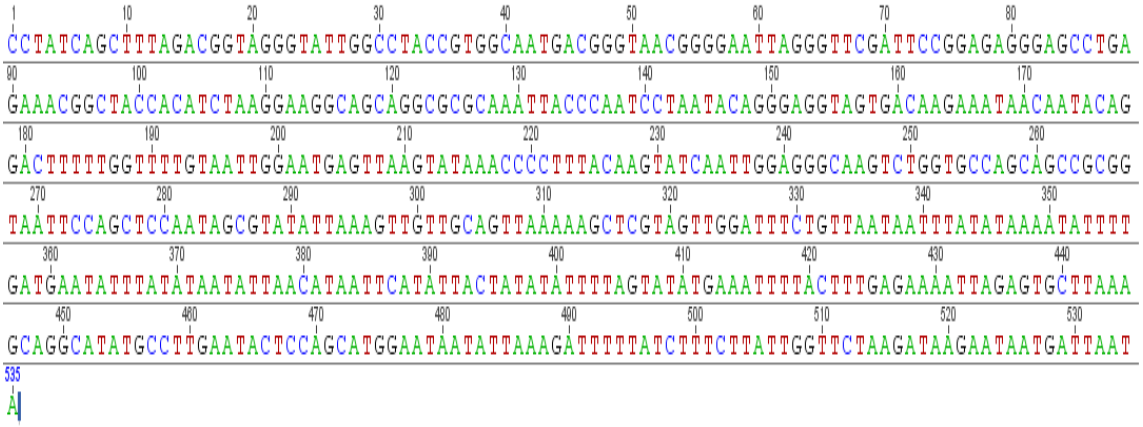
Cryptosporidium Small Subunit (SSU) rRNA Geni yönünden izolatlara ait DNA dizilerinin, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler olarak karakterize edilen tür dağılımı ve GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.6'da, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.8-4.18'de verilmiştir.

Tablo 4.6. Konya yöresinde buzağılarda belirlenen izolatların incelenen gen bölgesi, konak, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler ve GenBank aksesyon numaraları

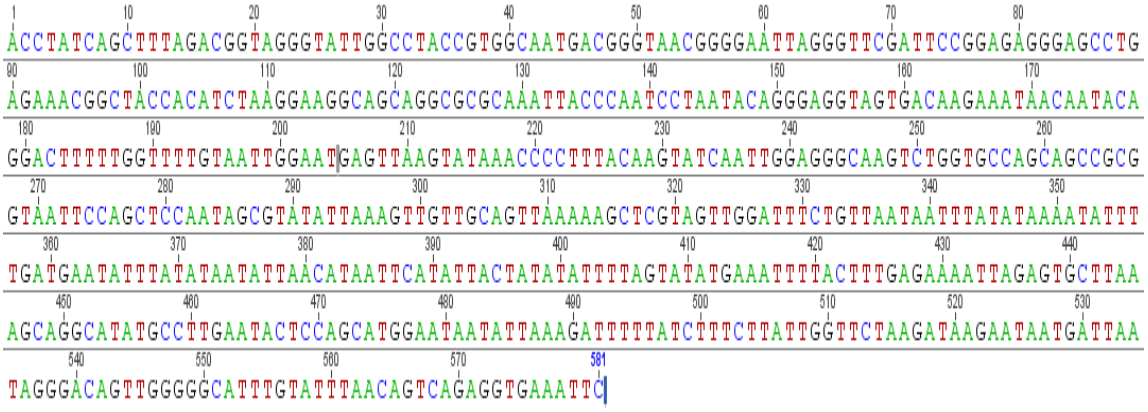
İzolat	***Gen bölgesi***	**Konak ve izolasyon kaynağı**	***Cryptosporidium* türü**	**Aksesyon Numarası**
TrKonCpar5	*(SSU) rRNA*	Buzağı/ oocyst	*C. parvum*	KF008173
TrKonCpar6	*(SSU) rRNA*	Buzağı/ oocyst	*C. parvum*	KF008174
TrKonCpar10	*(SSU) rRNA*	Buzağı/ oocyst	*C. parvum*	KF008175



Şekil 4.8. *C. parvum* TrKonCpar5 izolatının parsiyel 18S rRNA sekans dizilimi (KF008173)



Şekil 4.9. *C. parvum* TrKonCpar6 izolatının parsiyel 18S rRNA sekans dizilimi (KF008174)



Şekil 4.10. *C. parvum* TrKonCpar10 izolatının parsiyel 18S rRNA sekans dizilimi (KF008175)

Konya yöresinde buzağılardan elde edilen *Cryptosporidium* izolatlarıyla SSU rRNA gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan Türkiye ve Dünya'daki diğer *Cryptosporidium* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank'tan alınarak Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Türkiye ve Dünyadan filogenetik kıyaslaması yapılan diğer *Cryptosporidium* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

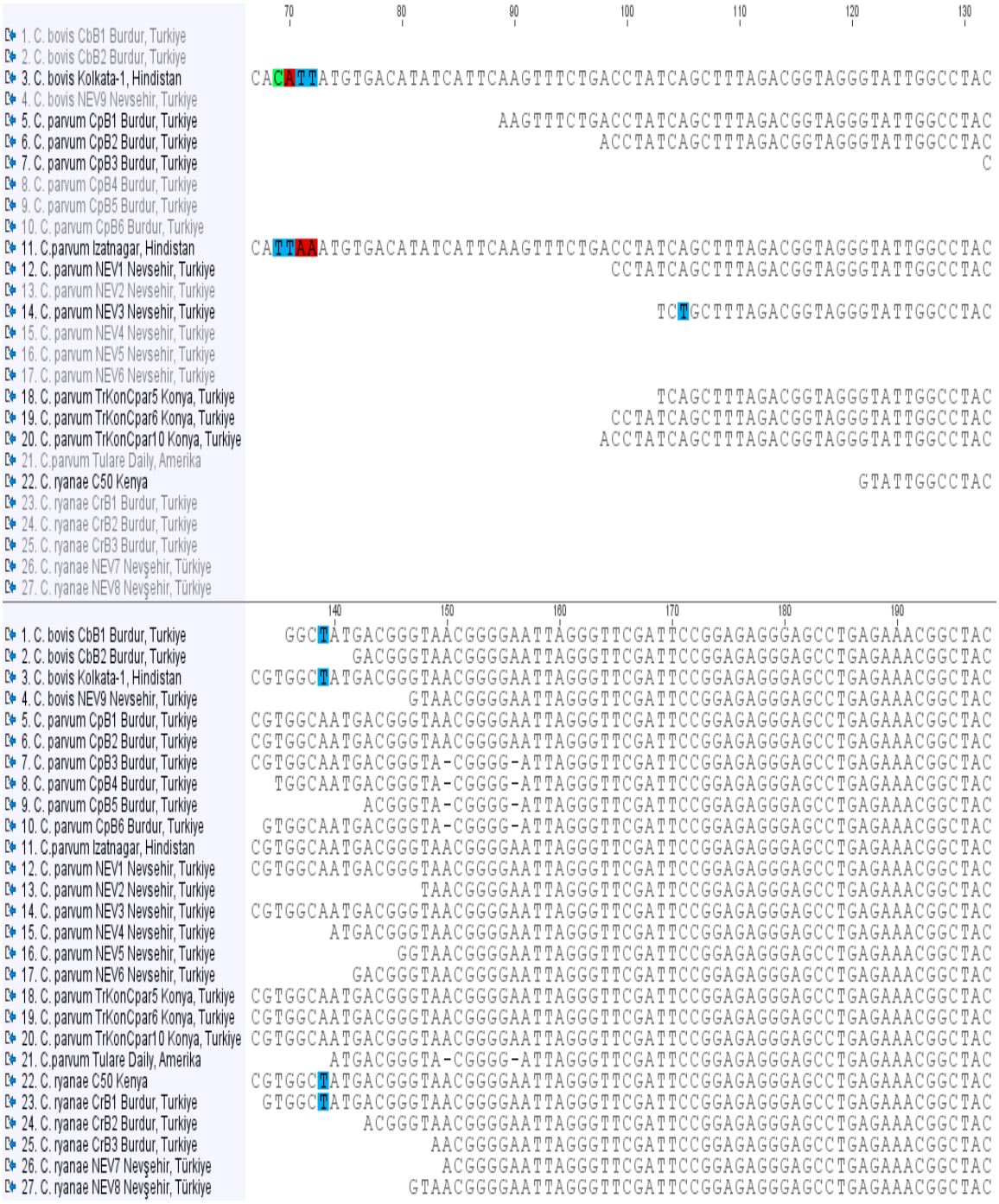
İzolat	**Orijin**	**İzolasyon kaynağı**	**Türler**	**Aksesyon Numarası**
NEV1	Türkiye-Nevşehir	Buzağı	*C. parvum*	JN245616
NEV2	Türkiye-Nevşehir	Buzağı	*C. parvum*	JN245617
NEV3	Türkiye-Nevşehir	Buzağı	*C. parvum*	JN245618
NEV4	Türkiye-Nevşehir	Buzağı	*C. parvum*	JN245619
NEV5	Türkiye-Nevşehir	Buzağı	*C. parvum*	JN245620
NEV6	Türkiye-Nevşehir	Buzağı	*C. parvum*	JN245621
Tulare Dairy	Amerika	Buzağı	*C. parvum*	FJ752165
CpB1	Türkiye-Burdur	Buzağı	*C. parvum*	JX886763
CpB2	Türkiye-Burdur	Buzağı	*C. parvum*	JX886764
CpB3	Türkiye-Burdur	Buzağı	*C. parvum*	JX886765
CpB4	Türkiye-Burdur	Buzağı	*C. parvum*	JX886766
CpB5	Türkiye-Burdur	Buzağı	*C. parvum*	JX886767
CpB6	Türkiye-Burdur	Buzağı	*C. parvum*	JX886768
Izatnagar	Hindistan	Buzağı	*C. parvum*	EF611871
NEV7	Türkiye-Nevşehir	Buzağı	*C. ryanae*	JN245622
NEV8	Türkiye-Nevşehir	Buzağı	*C. ryanae*	JN245623
CrB1	Türkiye-Burdur	Sığır	*C. ryanae*	JX886769
CrB1	Türkiye-Burdur	Sığır	*C. ryanae*	JX886770
CrB1	Türkiye-Burdur	Sığır	*C. ryanae*	JX886771
C50	Kenya	Sığır	*C. ryanae*	HQ259582
NEV9	Türkiye-Nevşehir	Buzağı	*C. bovis*	JN245624
CbB1	Türkiye-Burdur	Sığır	*C. bovis*	JX886772
CbB2	Türkiye-Burdur	Sığır	*C. bovis*	JX886773
Kolkata-1	Hindistan	Buzağı	*C. bovis*	GQ345005

Konya yöresinde buzağılarda pozitif belirlenen ve nükleotid dizisi ortaya konan izolatlar ile Türkiye ve Dünyanın çeşitli ülkelerinden multiple alignmenta dahil edilen diğer izolatların SSU rRNA gen bölgesine pairwise alignmentları Şekil 4.11’de verilmiştir.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1	C._parvum_TrKonCpar5_Konya_Turkiye																										
2	C._parvum_TrKonCpar6_Konya_Turkiye	0,000																									
3	C._parvum_TrKonCpar10_Konya_Turkiye	0,000	0,000																								
4	C._parvum_NEV1_Nevsehir_Turkiye	0,000	0,000	0,000																							
5	C._parvum_NEV2_Nevsehir_Turkiye	0,000	0,000	0,000	0,000																						
6	C._parvum_NEV3_Nevsehir_Turkiye	0,017	0,009	0,017	0,009	0,000																					
7	C._parvum_NEV4_Nevsehir_Turkiye	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,012																				
8	C._parvum_NEV5_Nevsehir_Turkiye	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																			
9	C._parvum_NEV6_Nevsehir_Turkiye	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																		
10	C._parvum_CpB1_Burdur_Turkiye	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,002	0,000	0,000																	
11	C._parvum_CpB2_Burdur_Turkiye	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000																
12	C._parvum_CpB3_Burdur_Turkiye	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,020	0,006	0,009	0,008	0,004	0,004															
13	C._parvum_CpB4_Burdur_Turkiye	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,020	0,006	0,009	0,008	0,004	0,004	0,000														
14	C._parvum_CpB5_Burdur_Turkiye	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,020	0,006	0,009	0,008	0,004	0,004	0,000	0,000													
15	C._parvum_CpB6_Burdur_Turkiye	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,020	0,006	0,009	0,008	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000												
16	C._parvum_Tulare_Daily_Amerika	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,020	0,006	0,009	0,008	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000											
17	C._parvum_Izatnagar_Hindistan	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004										
18	C._ryanae_NEV7_Nevsehir_Turkiye	0,033	0,033	0,033	0,033	0,033	0,033	0,033	0,027	0,024	0,033	0,033	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,033									
19	C._ryanae_NEV8_Nevsehir_Turkiye	0,059	0,059	0,059	0,059	0,050	0,068	0,059	0,026	0,024	0,059	0,060	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064	0,059	0,004								
20	C._ryanae_CrB1_Burdur_Turkiye	0,053	0,057	0,053	0,057	0,048	0,074	0,056	0,026	0,023	0,056	0,058	0,057	0,057	0,056	0,057	0,055	0,053	0,000	0,002							
21	C._ryanae_CrB2_Burdur_Turkiye	0,051	0,056	0,051	0,056	0,048	0,074	0,056	0,026	0,023	0,055	0,057	0,055	0,056	0,056	0,056	0,055	0,050	0,000	0,002	0,000						
22	C._ryanae_CrB3_Burdur_Turkiye	0,052	0,057	0,052	0,057	0,048	0,074	0,057	0,027	0,024	0,056	0,058	0,056	0,057	0,056	0,056	0,056	0,050	0,000	0,002	0,000	0,000					
23	C._ryanae_C50_Kenya	0,053	0,056	0,053	0,056	0,048	0,072	0,056	0,026	0,023	0,055	0,056	0,059	0,059	0,058	0,059	0,057	0,053	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000				
24	C._bovis_NEV9_Nevsehir_Turkiye	0,056	0,057	0,056	0,057	0,042	0,072	0,057	0,022	0,020	0,056	0,057	0,061	0,061	0,061	0,061	0,061	0,056	0,007	0,021	0,019	0,019	0,019	0,019			
25	C._bovis_CbB1_Burdur_Turkiye	0,051	0,055	0,051	0,055	0,042	0,072	0,054	0,022	0,019	0,055	0,056	0,055	0,055	0,054	0,055	0,053	0,050	0,007	0,019	0,015	0,015	0,016	0,016	0,002		
26	C._bovis_CbB2_Burdur_Turkiye	0,049	0,054	0,049	0,054	0,042	0,071	0,054	0,022	0,019	0,053	0,055	0,053	0,054	0,054	0,053	0,053	0,049	0,007	0,019	0,015	0,015	0,015	0,016	0,002	0,000	
27	C._bovis_Kolkata-1_Hindistan	0,048	0,051	0,047	0,051	0,042	0,070	0,054	0,022	0,019	0,050	0,052	0,054	0,055	0,054	0,055	0,053	0,075	0,007	0,019	0,015	0,015	0,015	0,015	0,002	0,000	0,000

Şekil 4.11. GenBank'a kayıtları yapılan Konya izolatlarıyla Türkiye ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların SSU rRNA gen dizilimlerinin pairwise analizleri

Konya yöresinden elde edilen *C. parvum* izolatları ile Türkiye ve Dünya'da GenBank'a kayıtlı diğer bazı *Cryptosporidium* izolatlarının, parsiyel SSU rRNA gen bölgelerinin multiple alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



```
                                          200       210       220       230       240       250       260
1. C. bovis CbB1 Burdur, Turkiye          CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
2. C. bovis CbB2 Burdur, Turkiye          CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
3. C. bovis Kolkata-1, Hindistan          CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
4. C. bovis NEV9 Nevsehir, Turkiye        CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
5. C. parvum CpB1 Burdur, Turkiye         CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
6. C. parvum CpB2 Burdur, Turkiye         CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
7. C. parvum CpB3 Burdur, Turkiye         CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
8. C. parvum CpB4 Burdur, Turkiye         CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
9. C. parvum CpB5 Burdur, Turkiye         CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
10. C. parvum CpB6 Burdur, Turkiye        CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
11. C.parvum Izatnagar, Hindistan         CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
12. C. parvum NEV1 Nevsehir, Turkiye      CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
13. C. parvum NEV2 Nevsehir, Turkiye      CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
14. C. parvum NEV3 Nevsehir, Turkiye      CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
15. C. parvum NEV4 Nevsehir, Turkiye      CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
16. C. parvum NEV5 Nevsehir, Turkiye      CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
17. C. parvum NEV6 Nevsehir, Turkiye      CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
18. C. parvum TrKonCpar5 Konya, Turkiye   CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
19. C. parvum TrKonCpar6 Konya, Turkiye   CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
20. C. parvum TrKonCpar10 Konya, Turkiye  CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
21. C.parvum Tulare Daily, Amerika        CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
22. C. ryanae C50 Kenya                   CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
23. C. ryanae CrB1 Burdur, Turkiye        CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
24. C. ryanae CrB2 Burdur, Turkiye        CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
25. C. ryanae CrB3 Burdur, Turkiye        CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
26. C. ryanae NEV7 Nevşehir, Türkiye      CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA
27. C. ryanae NEV8 Nevşehir, Türkiye      CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA

                                          270       280       290       300       310       320       330
1. C. bovis CbB1 Burdur, Turkiye          ATAACAATACAGAACCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAACAAGTAT
2. C. bovis CbB2 Burdur, Turkiye          ATAACAATACAGAACCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAACAAGTAT
3. C. bovis Kolkata-1, Hindistan          ATAACAATACAGAACCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAACAAGTAT
4. C. bovis NEV9 Nevsehir, Turkiye        ATAACAATACAGAACCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAACAAGTAT
5. C. parvum CpB1 Burdur, Turkiye         ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
6. C. parvum CpB2 Burdur, Turkiye         ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
7. C. parvum CpB3 Burdur, Turkiye         ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
8. C. parvum CpB4 Burdur, Turkiye         ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
9. C. parvum CpB5 Burdur, Turkiye         ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
10. C. parvum CpB6 Burdur, Turkiye        ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
11. C.parvum Izatnagar, Hindistan         ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
12. C. parvum NEV1 Nevsehir, Turkiye      ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
13. C. parvum NEV2 Nevsehir, Turkiye      ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
14. C. parvum NEV3 Nevsehir, Turkiye      ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
15. C. parvum NEV4 Nevsehir, Turkiye      ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
16. C. parvum NEV5 Nevsehir, Turkiye      ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
17. C. parvum NEV6 Nevsehir, Turkiye      ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
18. C. parvum TrKonCpar5 Konya, Turkiye   ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
19. C. parvum TrKonCpar6 Konya, Turkiye   ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
20. C. parvum TrKonCpar10 Konya, Turkiye  ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
21. C.parvum Tulare Daily, Amerika        ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTAT
22. C. ryanae C50 Kenya                   ATAACAATACAGAGCCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAACAAGTAT
23. C. ryanae CrB1 Burdur, Turkiye        ATAACAATACAGAGCCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAACAAGTAT
24. C. ryanae CrB2 Burdur, Turkiye        ATAACAATACAGAGCCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAACAAGTAT
25. C. ryanae CrB3 Burdur, Turkiye        ATAACAATACAGAGCCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAACAAGTAT
26. C. ryanae NEV7 Nevşehir, Türkiye      ATAACAATACAGAGCCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAACAAGTAT
27. C. ryanae NEV8 Nevşehir, Türkiye      ATAACAATACAGAGCCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAACAAGTAT
```

```
                                        340       350       360       370       380       390
1. C. bovis CbB1 Burdur, Turkiye        CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
2. C. bovis CbB2 Burdur, Turkiye        CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
3. C. bovis Kolkata-1, Hindistan        CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
4. C. bovis NEV9 Nevsehir, Turkiye      CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
5. C. parvum CpB1 Burdur, Turkiye       CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
6. C. parvum CpB2 Burdur, Turkiye       CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
7. C. parvum CpB3 Burdur, Turkiye       CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
8. C. parvum CpB4 Burdur, Turkiye       CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
9. C. parvum CpB5 Burdur, Turkiye       CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
10. C. parvum CpB6 Burdur, Turkiye      CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
11. C.parvum Izatnagar, Hindistan       CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
12. C. parvum NEV1 Nevsehir, Turkiye    CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
13. C. parvum NEV2 Nevsehir, Turkiye    CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
14. C. parvum NEV3 Nevsehir, Turkiye    CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
15. C. parvum NEV4 Nevsehir, Turkiye    CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
16. C. parvum NEV5 Nevsehir, Turkiye    CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCC
17. C. parvum NEV6 Nevsehir, Turkiye    CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
18. C. parvum TrKonCpar5 Konya, Turkiye CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
19. C. parvum TrKonCpar6 Konya, Turkiye CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
20. C. parvum TrKonCpar10 Konya, Turkiye CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
21. C.parvum Tulare Daily, Amerika      CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
22. C. ryanae C50 Kenya                 CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
23. C. ryanae CrB1 Burdur, Turkiye      CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
24. C. ryanae CrB2 Burdur, Turkiye      CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
25. C. ryanae CrB3 Burdur, Turkiye      CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
26. C. ryanae NEV7 Nevşehir, Türkiye    CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT
27. C. ryanae NEV8 Nevşehir, Türkiye    CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT

                                        400       410       420       430       440       450       460
1. C. bovis CbB1 Burdur, Turkiye        TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATCTTCTGTTAAT-TTTTATATATAATATCACGAT----A
2. C. bovis CbB2 Burdur, Turkiye        TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATCTTCTGTTAAT-TTTTATATATAATATCACGAT----A
3. C. bovis Kolkata-1, Hindistan        TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATCTTCTGTTAAT-TTTTATATATAATATCACGAT----A
4. C. bovis NEV9 Nevsehir, Turkiye      TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATCTTCTGTTAAT-TTTTATATATAATATCACGAT----A
5. C. parvum CpB1 Burdur, Turkiye       TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATA
6. C. parvum CpB2 Burdur, Turkiye       TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATA
7. C. parvum CpB3 Burdur, Turkiye       TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATA
8. C. parvum CpB4 Burdur, Turkiye       TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATA
9. C. parvum CpB5 Burdur, Turkiye       TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATA
10. C. parvum CpB6 Burdur, Turkiye      TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATA
11. C.parvum Izatnagar, Hindistan       TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATA
12. C. parvum NEV1 Nevsehir, Turkiye    TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATA
13. C. parvum NEV2 Nevsehir, Turkiye    TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATA
14. C. parvum NEV3 Nevsehir, Turkiye    TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATA
15. C. parvum NEV4 Nevsehir, Turkiye    TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATAAATA
16. C. parvum NEV5 Nevsehir, Turkiye
17. C. parvum NEV6 Nevsehir, Turkiye    TGTTGC
18. C. parvum TrKonCpar5 Konya, Turkiye TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATA
19. C. parvum TrKonCpar6 Konya, Turkiye TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATA
20. C. parvum TrKonCpar10 Konya, Turkiye TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATA
21. C.parvum Tulare Daily, Amerika      TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATA
22. C. ryanae C50 Kenya                 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTCTGTTAAT-TTTTATATACAATGCTACGGT----A
23. C. ryanae CrB1 Burdur, Turkiye      TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTCTGTTAAT-TTTTATATACAATGCTACGGT----A
24. C. ryanae CrB2 Burdur, Turkiye      TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTCTGTTAAT-TTTTATATACAATGCTACGGT----A
25. C. ryanae CrB3 Burdur, Turkiye      TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTCTGTTAAT-TTTTATATACAATGCTACGGT----A
26. C. ryanae NEV7 Nevşehir, Türkiye    TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTAATTTTCTGT
27. C. ryanae NEV8 Nevşehir, Türkiye    TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTACTTAATTTTCTGTTAAT-TTTTATATACAATGCTACGGT----A
```

```
                                        470       480       490       500       510       520
1. C. bovis CbB1 Burdur, Turkiye        TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACT-----TTTTAGTATATGAAACTTTACTTTGAGAAA
2. C. bovis CbB2 Burdur, Turkiye        TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACT-----TTTTAGTATATGAAACTTTACTTTGAGAAA
3. C. bovis Kolkata-1, Hindistan        TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACT-----TTTTAGTATATGAAACTTTACTTTGAGAAA
4. C. bovis NEV9 Nevsehir, Turkiye      TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACT-----TTTTAGTATATGAAACTTTACTTTGAGAAA
5. C. parvum CpB1 Burdur, Turkiye       TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA
6. C. parvum CpB2 Burdur, Turkiye       TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA
7. C. parvum CpB3 Burdur, Turkiye       TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA
8. C. parvum CpB4 Burdur, Turkiye       TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA
9. C. parvum CpB5 Burdur, Turkiye       TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA
10. C. parvum CpB6 Burdur, Turkiye      TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA
11. C.parvum Izatnagar, Hindistan       TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA
12. C. parvum NEV1 Nevsehir, Turkiye    TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA
13. C. parvum NEV2 Nevsehir, Turkiye    TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAA
14. C. parvum NEV3 Nevsehir, Turkiye    TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA
15. C. parvum NEV4 Nevsehir, Turkiye    TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA
16. C. parvum NEV5 Nevsehir, Turkiye
17. C. parvum NEV6 Nevsehir, Turkiye
18. C. parvum TrKonCpar5 Konya, Turkiye TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA
19. C. parvum TrKonCpar6 Konya, Turkiye TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA
20. C. parvum TrKonCpar10 Konya, Turkiye TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA
21. C.parvum Tulare Daily, Amerika      TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAA
22. C. ryanae C50 Kenya                 TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACT-----TTTTAGTATATGAAACTTTACTTTGAGAAA
23. C. ryanae CrB1 Burdur, Turkiye      TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACT-----TTTTAGTATATGAAACTTTACTTTGAGAAA
24. C. ryanae CrB2 Burdur, Turkiye      TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACT-----TTTTAGTATATGAAACTTTACTTTGAGAAA
25. C. ryanae CrB3 Burdur, Turkiye      TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACT-----TTTTAGTATATGAAACTTTACTTTGAGAAA
26. C. ryanae NEV7 Nevşehir, Türkiye
27. C. ryanae NEV8 Nevşehir, Türkiye    TTTATATAATATTAACATAATTCATATTACT-----TTTTAGTATATGAAACTTTACTTTGAGAAA

                                        530       540       550       560       570       580       590
1. C. bovis CbB1 Burdur, Turkiye        ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGGATTTTTA
2. C. bovis CbB2 Burdur, Turkiye        ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGGATTTTTA
3. C. bovis Kolkata-1, Hindistan        ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGGATTTTTA
4. C. bovis NEV9 Nevsehir, Turkiye      ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAACATGGAATAATATTAAGGATTTTTA
5. C. parvum CpB1 Burdur, Turkiye       ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTA
6. C. parvum CpB2 Burdur, Turkiye       ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTA
7. C. parvum CpB3 Burdur, Turkiye       ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTA
8. C. parvum CpB4 Burdur, Turkiye       ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTA
9. C. parvum CpB5 Burdur, Turkiye       ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTA
10. C. parvum CpB6 Burdur, Turkiye      ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTA
11. C.parvum Izatnagar, Hindistan       ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTA
12. C. parvum NEV1 Nevsehir, Turkiye    ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTA
13. C. parvum NEV2 Nevsehir, Turkiye
14. C. parvum NEV3 Nevsehir, Turkiye    ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTA
15. C. parvum NEV4 Nevsehir, Turkiye    ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTA
16. C. parvum NEV5 Nevsehir, Turkiye
17. C. parvum NEV6 Nevsehir, Turkiye
18. C. parvum TrKonCpar5 Konya, Turkiye ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTA
19. C. parvum TrKonCpar6 Konya, Turkiye ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTA
20. C. parvum TrKonCpar10 Konya, Turkiye ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTA
21. C.parvum Tulare Daily, Amerika      ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAAGATTTTTA
22. C. ryanae C50 Kenya                 ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGGATTTTTA
23. C. ryanae CrB1 Burdur, Turkiye      ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGGATTTTTA
24. C. ryanae CrB2 Burdur, Turkiye      ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGGATTTTTA
25. C. ryanae CrB3 Burdur, Turkiye      ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGGATTTTTA
26. C. ryanae NEV7 Nevşehir, Türkiye
27. C. ryanae NEV8 Nevşehir, Türkiye    ATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGGATTTTTA
```

Şekil 4.12. Konya yöresinde buzağılarda belirlenen *C. parvum* izolatları ile Türkiye ve Dünyadaki diğer bazı *Cryptosporidium* izolatlarının parsiyel SSU rRNA gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları

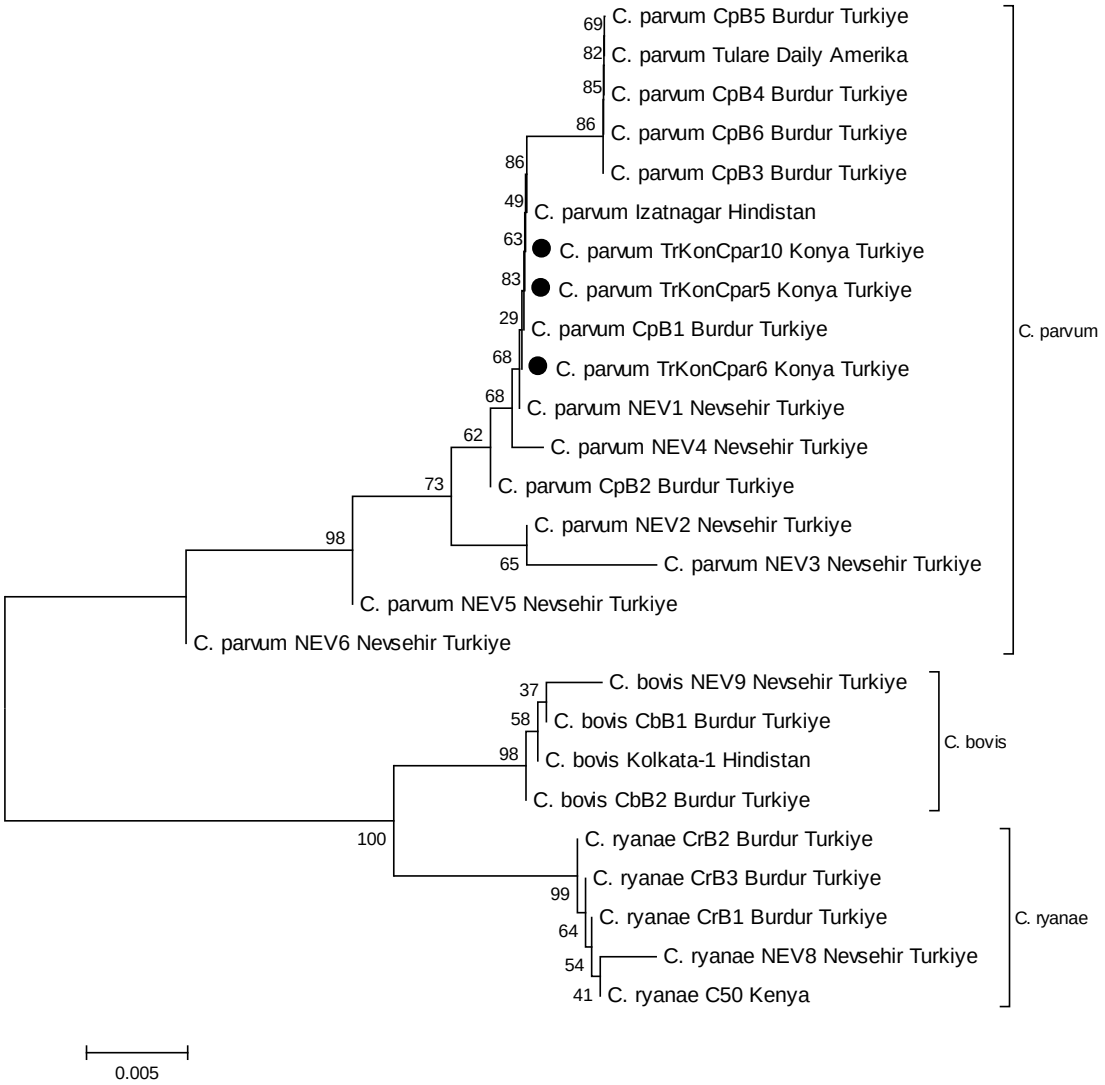
Şekil 4.12'de görüldüğü gibi SSU rRNA gen bölgesine göre saptanan *Cryptosporidium* izolatları arasında türe özgü olarak çeşitli nükleotid değişimleri, delesyonları ve insertionları belirlenmiştir.

C. parvum belirlenen Konya izolatlarının (TrKonCpar5, TrKonCpar6, TrKonCpar10) SSU rRNA gen bölgesinin pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında %100 identik oldukları, Türkiye'de *C. parvum* Nevsehir izolatlarıyla %0,3±0,1, Burdur izolatlarıyla

ise %0,3±0,2 farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. *C. parvum* Konya izolatlarının ayrıca Hindistan'da buzağıdan elde edilmiş Izatnagar izolatıyla %100 identik olduğu, Amerika'da yine buzağıdan izole edilmiş Tulare Daily izolatıyla ise %0,4 genetik farklılık gösterdiği saptanmıştır.

Konya yöresinde buzağılarda saptanan *C. parvum* izolatları ile Türkiye ve Dünyadan diğer bazı izolatların Neighbor Joining Metodu (Kimura 2 Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.13'de verilmiştir. Filogenetik ağaçta da görüleceği üzere saptanan izolatların tür bazlı olarak kendi gruplarında yer aldığı belirlenmiştir.

Genetik farklılık, *C. parvum* ve *C. ryanae* grupları arasında ortalama %2,2±0,4; *C. parvum* ve *C. bovis* arasında ise %1,9±0,3 olarak saptanmıştır.



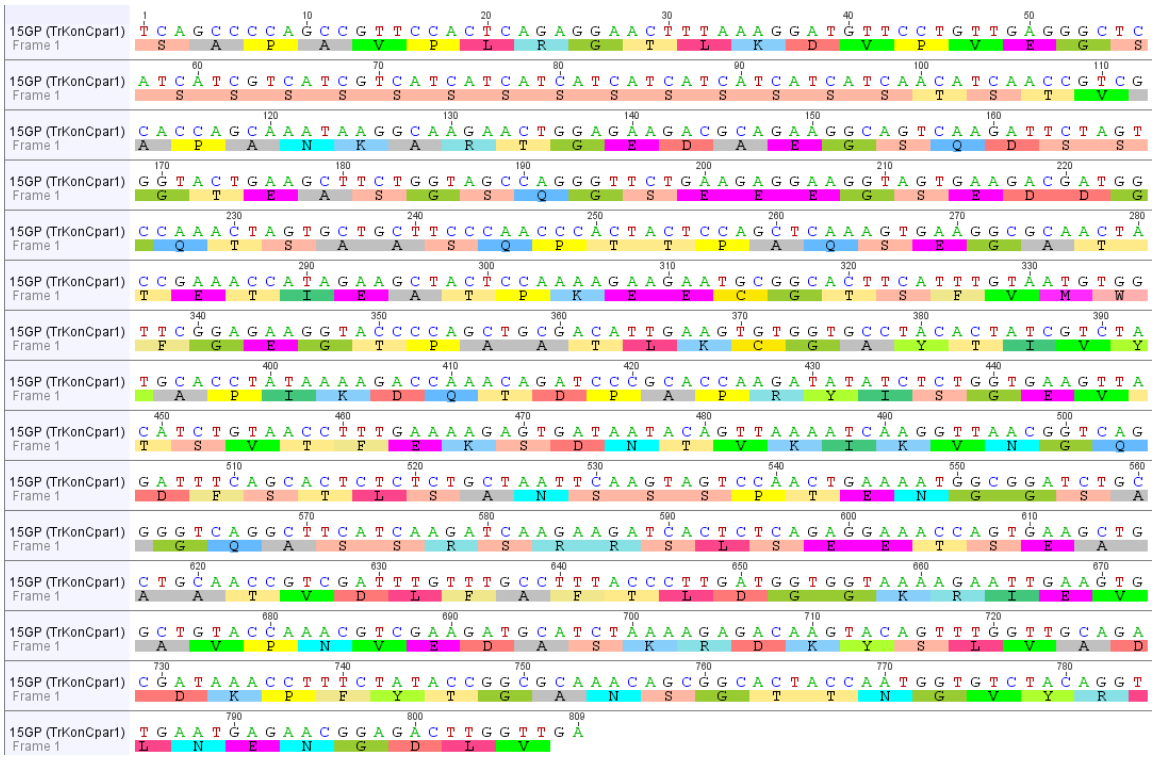
Şekil 4.13. Konya yöresinde saptanan *C. parvum* izolatları(●) ile GenBank'a kayıtlı Türkiye ve Dünyadan diğer bazı izolatların SSU rRNA gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter modeli).

4.7.2. *C. parvum* 60 kDa Glycoprotein (GP60) Geninin Sekansı, Filogenetik Analizi ve Alt Genotiplerin Belirlenmesi

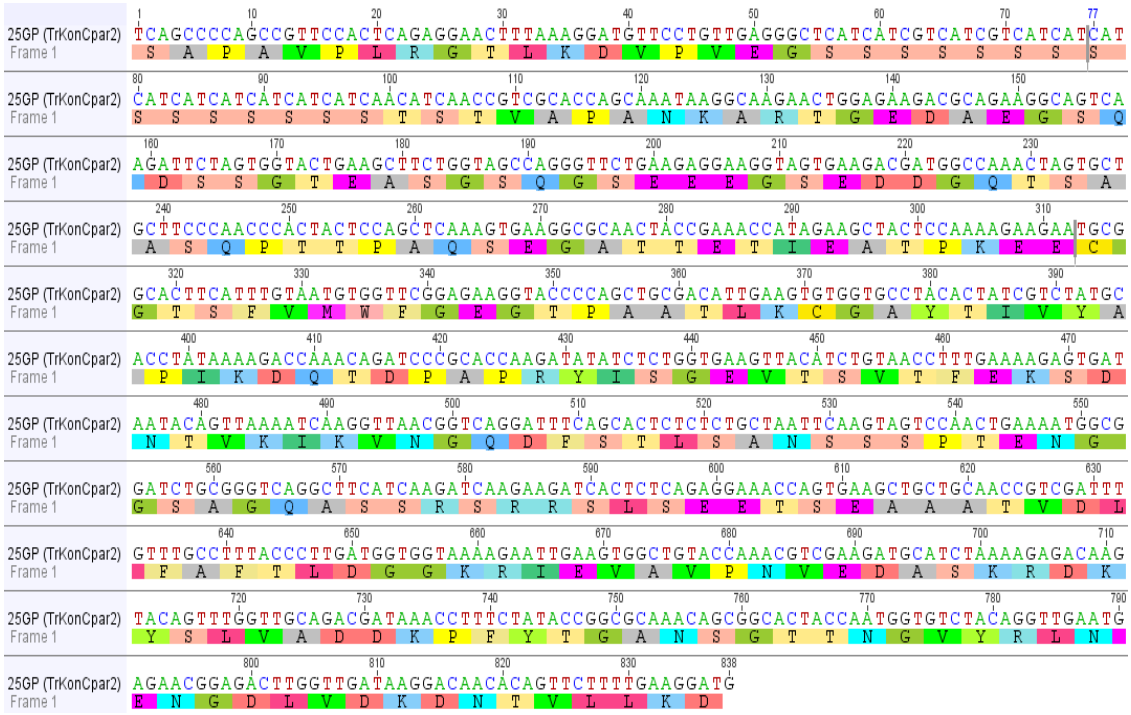
C. parvum 60 kDa glycoprotein (GP60) geni yönünden izolatlara ait DNA dizilerinin, konak ve izolasyon kaynağı ile moleküler olarak karakterize edilen alt genotipler ve GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.8'de, nükleotid ve aminoasit kompozisyonları ise Şekil 4.14-4.23'de verilmiştir.

Tablo 4.8. Konya yöresinde buzağılarda belirlenen *C. parvum* izolatlarının incelenen gen bölgesi, konak ve izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen genotipleri ve GenBank aksesyon numaraları

İzolat	***Gen bölgesi***	**Konak ve izolasyon kaynağı**	**Alt Genotip**	**Aksesyon Numarası**
TrKonCpar1	*GP60*	Buzağı/ oocyst	IIaA13G2R1	KF008176
TrKonCpar2	*GP60*	Buzağı/ oocyst	IIaA13G2R1	KF008177
TrKonCpar3	*GP60*	Buzağı/ oocyst	IIaA13G2R1	KF008178
TrKonCpar4	*GP60*	Buzağı/ oocyst	IIaA13G2R1	KF008179
TrKonCpar5	*GP60*	Buzağı/ oocyst	IIaA13G2R1	KF008180
TrKonCpar6	*GP60*	Buzağı/ oocyst	IIaA13G2R1	KF008181
TrKonCpar7	*GP60*	Buzağı/ oocyst	IIaA13G2R1	KF008182
TrKonCpar8	*GP60*	Buzağı/ oocyst	IIaA13G2R1	KF008183
TrKonCpar9	*GP60*	Buzağı/ oocyst	IIaA13G2R1	KF008184
TrKonCpar10	*GP60*	Buzağı/ oocyst	IIaA13G2R1	KF008185

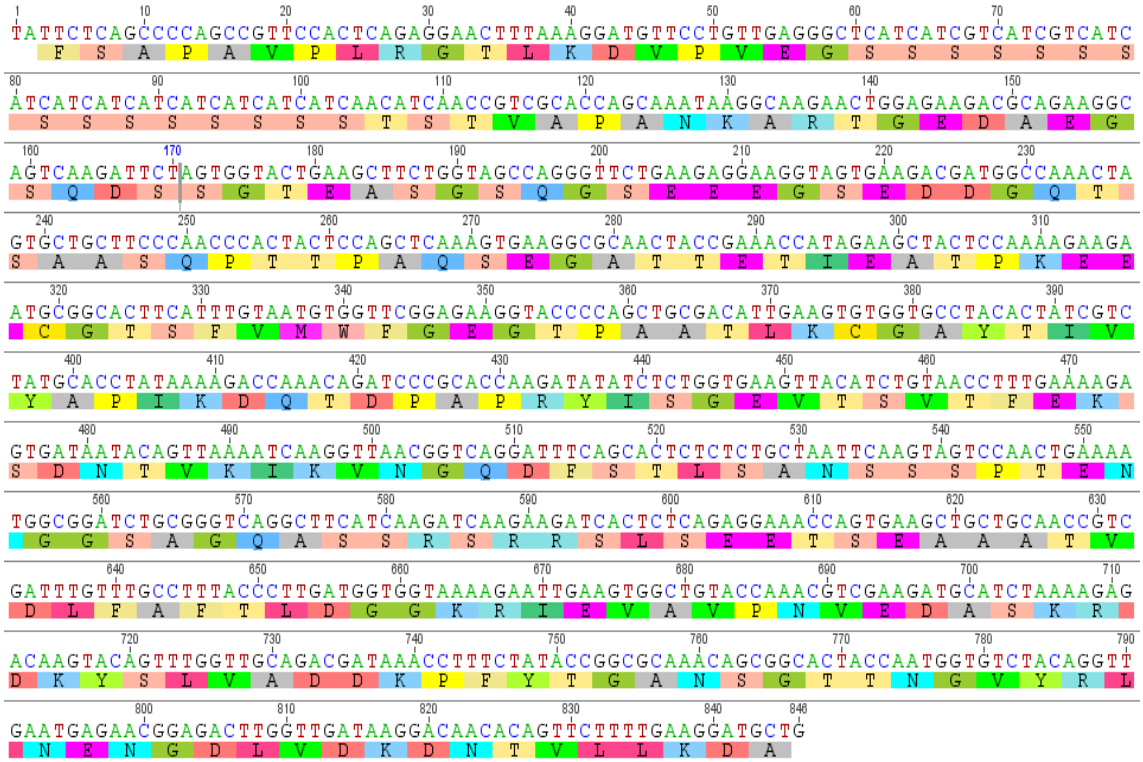


Şekil 4.14. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar1 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları (KF008176)

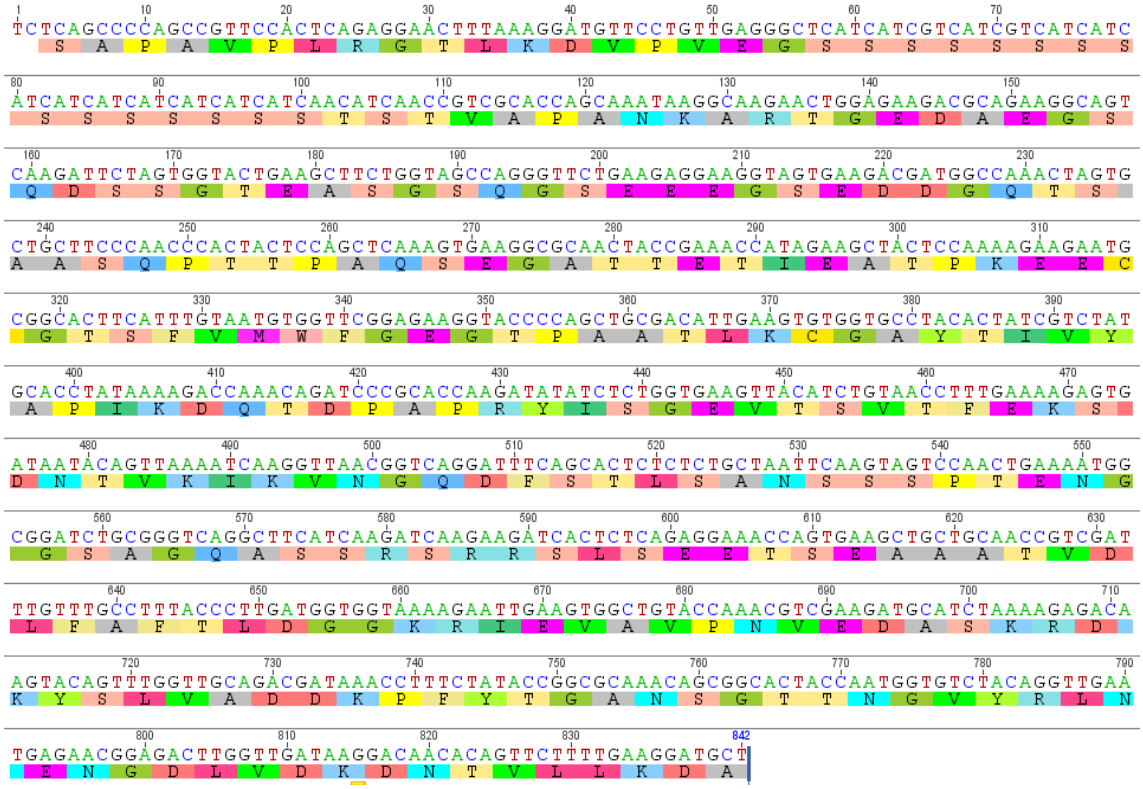


Şekil 4.15. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar2 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları (KF008177)

Şekil 4.16. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar3 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları (KF008178)



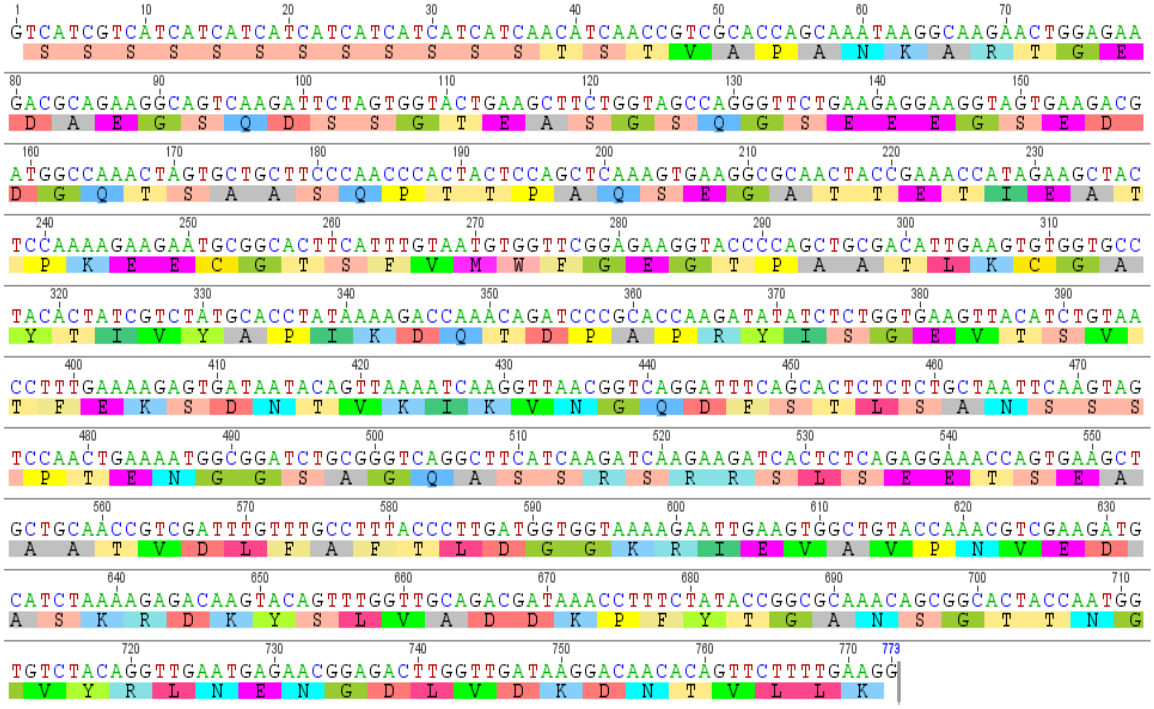
Şekil 4.17. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar4 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları (KF008179)



Şekil 4.18. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar5 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları (KF008180)

Şekil 4.19. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar6 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları (KF008181)

Şekil 4.20. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar7 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları (KF008182)



Şekil 4.21. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar8 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları (KF008183)

Şekil 4.22. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar9 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları (KF008184)

Şekil 4.23. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait TrKonCpar10 izolatının GP60 genine ait nükleotid ve aminoasit sekansları (KF008185)

Konya yöresinde buzağılardan elde edilen *C. parvum* alt genotiplerine ait izolatlarla GP60 gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan Türkiye ve Dünya'dan diğer bazı *C. parvum* alt genotiplerine ait izolatların aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9. Türkiye ve Dünyadan GP60 gen bölgesi yönünden filogenetik kıyaslaması yapılan buzağılardaki diğer *C. parvum* alt genotiplerine ait izolatların aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	**Orijin**	**Alt Genotip**	**GenBank Aksesyon Numarası**
NEV1	Türkiye-Nevşehir	*IIaA14G1R1*	JQ026102
NEV2	Türkiye-Nevşehir	*IIaA14G1R1*	JQ026103
NEV3	Türkiye-Nevşehir	*IIaA14G1R1*	JQ030882
NEV4	Türkiye-Nevşehir	*IIaA13G2R1*	JQ034314
NEV5	Türkiye-Nevşehir	*IIaA13G2R1*	JQ034315
NEV6	Türkiye-Nevşehir	*IIaA13G2R1*	JQ034316
BCR-1	Türkiye-Burdur	*IIaA13G2R1*	JX826593
BCR-2	Türkiye-Burdur	*IIaA13G2R1*	JX826594
BCR-3	Türkiye-Burdur	*IIaA13G2R1*	JX826595
BCR-4	Türkiye-Burdur	*IIaA13G2R1*	JX826596
BCR-5	Türkiye-Burdur	*IIaA13G2R1*	JX826597

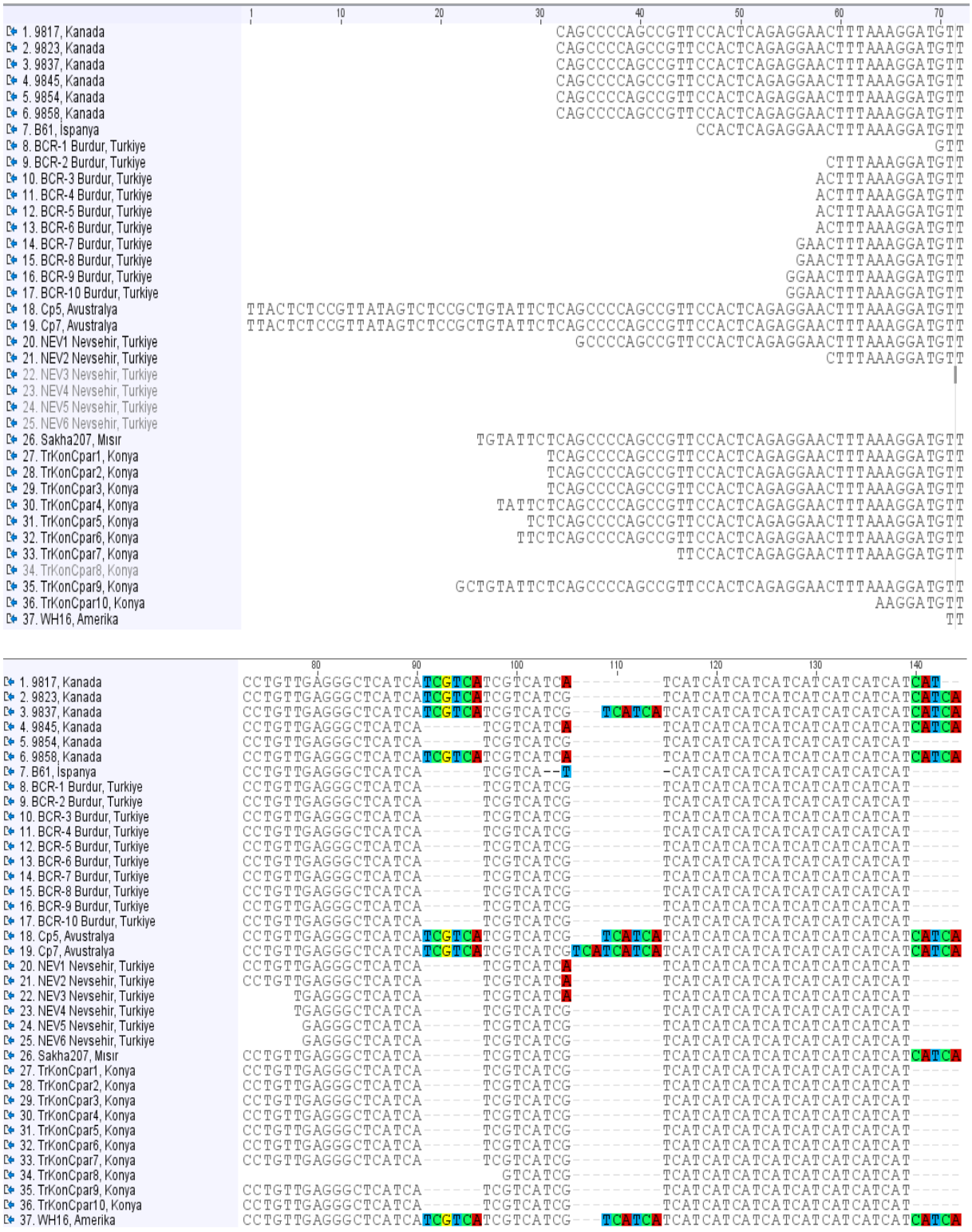
BCR-6	Türkiye-Burdur	*IIaA13G2R1*	JX826598
BCR-7	Türkiye-Burdur	*IIaA13G2R1*	JX826599
BCR-8	Türkiye-Burdur	*IIaA13G2R1*	JX826600
BCR-9	Türkiye-Burdur	*IIaA13G2R1*	JX826601
BCR-10	Türkiye-Burdur	*IIaA13G2R1*	JX826602
9854	Kanada	*IIaA13G2R1*	DQ192502
9845	Kanada	*IIaA16G1R1*	DQ192504
B61	İspanya	*IIaA13G1R1*	GU111578
9817	Kanada	*IIaA16G2R1*	DQ192505
9858	Kanada	*IIaA17G2R1*	DQ192507
Sakha207	Mısır	*IIaA15G2R1*	AB514090
9823	Kanada	*IIaA16G3R1*	DQ192506
9837	Kanada	*IIaA18G3R1*	DQ192508
Cp7	Avustralya	*IIaA20G3R1*	GU214362
WH16	ABD	*IIaA16G3R2*	DQ640632
Cp5	Avustralya	*IIaA19G3R1*	GU214360

Konya yöresinde buzağılarda *C. parvum* alt genotiplemesi yapılan ve nükleotid dizisi ortaya konan izolatlar ile Türkiye ve diğer bazı ülkelerden multiple alignmenta dahil edilen izolatların GP60 gen bölgesine göre pairwise alignmentları Şekil 4.24'de verilmiştir.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
1	TrKonCpar1_Konya_{IIaA13G2R1}																																				
2	TrKonCpar2_Konya_{IIaA13G2R1}	0,000																																			
3	TrKonCpar3_Konya_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000																																		
4	TrKonCpar4_Konya_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000																																	
5	TrKonCpar5_Konya_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000																																
6	TrKonCpar6_Konya_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																															
7	TrKonCpar7_Konya_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																														
8	TrKonCpar8_Konya_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																													
9	TrKonCpar9_Konya_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																												
10	TrKonCpar10_Konya_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																											
11	BCR-1_Burdur_Turkiye_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																										
12	BCR-2_Burdur_Turkiye_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																									
13	BCR-3_Burdur_Turkiye_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																								
14	BCR-4_Burdur_Turkiye_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																							
15	BCR-5_Burdur_Turkiye_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																						
16	BCR-6_Burdur_Turkiye_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																					
17	BCR-7_Burdur_Turkiye_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																				
18	BCR-8_Burdur_Turkiye_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																			
19	BCR-9_Burdur_Turkiye_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																		
20	BCR-10_Burdur_Turkiye_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																	
21	NEV1_Nevsehir_Turkiye_{IIaA14G1R1}	0,002	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004																
22	NEV2_Nevsehir_Turkiye_{IIaA14G1R1}	0,003	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,000															
23	NEV3_Nevsehir_Turkiye_{IIaA14G1R1}	0,003	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,000	0,000														
24	NEV4_Nevsehir_Turkiye_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,003	0,003													
25	NEV5_Nevsehir_Turkiye_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,004	0,004	0,000												
26	NEV6_Nevsehir_Turkiye_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,004	0,004	0,000	0,000											
27	9817_Kanada_{IIaA16G2R1}	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003	0,003	0,001	0,001	0,001										
28	9823_Kanada_{IIaA16G3R1}	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001									
29	9837_Kanada_{IIaA18G3R1}	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000								
30	9845_Kanada_{IIaA16G1R1}	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001							
31	9854_Kanada_{IIaA13G2R1}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001						
32	9858_Kanada_{IIaA17G2R1}	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003	0,003	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001					
33	B61_Ispanya_{IIaA13G1R1}	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001				
34	Cp5_Avustralya_{IIaA19G3R1}	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,003	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001			
35	Cp7_Avustralya_{IIaA20G3R1}	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,007	0,006	0,001	0,004	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000		
36	Sakha207_Misir_{IIaA15G2R1}	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003	0,003	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	
37	WH16_Amerika_{IIaA16G3R2}	0,003	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,004	0,004	0,003	0,003	0,004	0,004	0,004	0,004	0,003	0,003	0,003

Şekil 4.24. GenBank'a kayıtları yapılan Konya izolatlarıyla Türkiye ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı izolatların GP60 gen dizilimlerinin pairwise analizleri

Konya yöresinde buzağılardan elde edilen *C. parvum* alt genotiplerine ait izolatlar ile Türkiye ve Dünya'da GenBank'a kayıtlı diğer bazı alt genotiplere ait izolatların, GP60 gen bölgelerinin multiple alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.25'de gösterilmiştir.



```
                                   150       160       170       180       190       200       210
1. 9817, Kanada                    -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
2. 9823, Kanada                    TCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
3. 9837, Kanada                    TCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
4. 9845, Kanada                    TCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
5. 9854, Kanada                    -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
6. 9858, Kanada                    TCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
7. B61, İspanya                    -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
8. BCR-1 Burdur, Turkiye           -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
9. BCR-2 Burdur, Turkiye           -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
10. BCR-3 Burdur, Turkiye          -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
11. BCR-4 Burdur, Turkiye          -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
12. BCR-5 Burdur, Turkiye          -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
13. BCR-6 Burdur, Turkiye          -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
14. BCR-7 Burdur, Turkiye          -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
15. BCR-8 Burdur, Turkiye          -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
16. BCR-9 Burdur, Turkiye          -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
17. BCR-10 Burdur, Turkiye         -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
18. Cp5, Avustralya                TCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
19. Cp7, Avustralya                TCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
20. NEV1 Nevsehir, Turkiye         -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
21. NEV2 Nevsehir, Turkiye         -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
22. NEV3 Nevsehir, Turkiye         -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
23. NEV4 Nevsehir, Turkiye         -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
24. NEV5 Nevsehir, Turkiye         -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
25. NEV6 Nevsehir, Turkiye         -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
26. Sakha207, Mısır                TCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
27. TrKonCpar1, Konya              -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
28. TrKonCpar2, Konya              -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
29. TrKonCpar3, Konya              -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
30. TrKonCpar4, Konya              -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
31. TrKonCpar5, Konya              -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
32. TrKonCpar6, Konya              -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
33. TrKonCpar7, Konya              -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
34. TrKonCpar8, Konya              -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
35. TrKonCpar9, Konya              -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
36. TrKonCpar10, Konya             -CATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
37. WH16, Amerika                  ACATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGAAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCT
```

```
                                   220       230       240       250       260       270       280
1. 9817, Kanada                    AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
2. 9823, Kanada                    AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
3. 9837, Kanada                    AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
4. 9845, Kanada                    AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
5. 9854, Kanada                    AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
6. 9858, Kanada                    AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
7. B61, İspanya                    AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGGCGATGGCCAAACTAGTGCT
8. BCR-1 Burdur, Turkiye           AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
9. BCR-2 Burdur, Turkiye           AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
10. BCR-3 Burdur, Turkiye          AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
11. BCR-4 Burdur, Turkiye          AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
12. BCR-5 Burdur, Turkiye          AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
13. BCR-6 Burdur, Turkiye          AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
14. BCR-7 Burdur, Turkiye          AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
15. BCR-8 Burdur, Turkiye          AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
16. BCR-9 Burdur, Turkiye          AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
17. BCR-10 Burdur, Turkiye         AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
18. Cp5, Avustralya                AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
19. Cp7, Avustralya                AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
20. NEV1 Nevsehir, Turkiye         AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGGCGATGGCCAAACTAGTGCT
21. NEV2 Nevsehir, Turkiye         AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGGCGATGGCCAAACTAGTGCT
22. NEV3 Nevsehir, Turkiye         AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGGCGATGGCCAAACTAGTGCT
23. NEV4 Nevsehir, Turkiye         AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
24. NEV5 Nevsehir, Turkiye         AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
25. NEV6 Nevsehir, Turkiye         AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
26. Sakha207, Mısır                AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
27. TrKonCpar1, Konya              AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
28. TrKonCpar2, Konya              AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
29. TrKonCpar3, Konya              AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
30. TrKonCpar4, Konya              AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
31. TrKonCpar5, Konya              AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
32. TrKonCpar6, Konya              AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
33. TrKonCpar7, Konya              AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
34. TrKonCpar8, Konya              AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
35. TrKonCpar9, Konya              AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
36. TrKonCpar10, Konya             AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
37. WH16, Amerika                  AGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCT
```

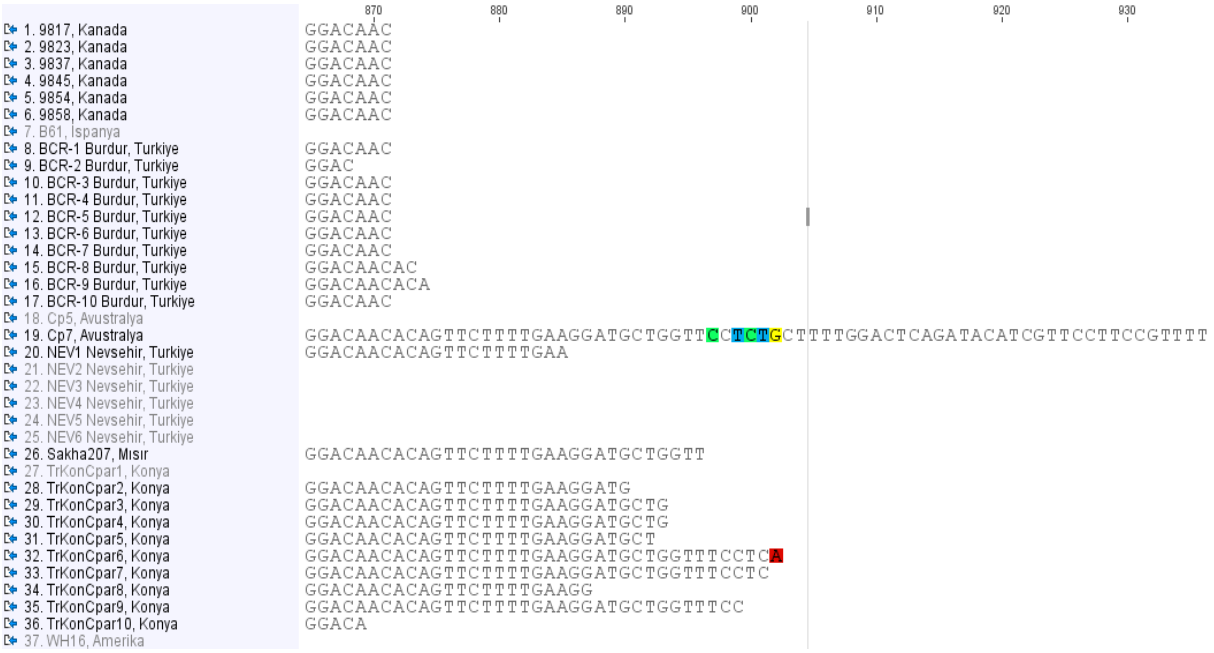
```
                                   290       300       310       320       330       340       350       360
1. 9817, Kanada                    GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
2. 9823, Kanada                    GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
3. 9837, Kanada                    GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
4. 9845, Kanada                    GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
5. 9854, Kanada                    GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
6. 9858, Kanada                    GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
7. B61, İspanya                    GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
8. BCR-1 Burdur, Turkiye           GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
9. BCR-2 Burdur, Turkiye           GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
10. BCR-3 Burdur, Turkiye          GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
11. BCR-4 Burdur, Turkiye          GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
12. BCR-5 Burdur, Turkiye          GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
13. BCR-6 Burdur, Turkiye          GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
14. BCR-7 Burdur, Turkiye          GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
15. BCR-8 Burdur, Turkiye          GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
16. BCR-9 Burdur, Turkiye          GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
17. BCR-10 Burdur, Turkiye         GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
18. Cp5, Avustralya                GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
19. Cp7, Avustralya                GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
20. NEV1 Nevsehir, Turkiye         GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
21. NEV2 Nevsehir, Turkiye         GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
22. NEV3 Nevsehir, Turkiye         GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
23. NEV4 Nevsehir, Turkiye         GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
24. NEV5 Nevsehir, Turkiye         GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
25. NEV6 Nevsehir, Turkiye         GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
26. Sakha207, Mısır                GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
27. TrKonCpar1, Konya              GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
28. TrKonCpar2, Konya              GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
29. TrKonCpar3, Konya              GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
30. TrKonCpar4, Konya              GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
31. TrKonCpar5, Konya              GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
32. TrKonCpar6, Konya              GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
33. TrKonCpar7, Konya              GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
34. TrKonCpar8, Konya              GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
35. TrKonCpar9, Konya              GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
36. TrKonCpar10, Konya             GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
37. WH16, Amerika                  GCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAA
                                             370       380       390       400       410       420       430
1. 9817, Kanada                    GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
2. 9823, Kanada                    GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
3. 9837, Kanada                    GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
4. 9845, Kanada                    GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
5. 9854, Kanada                    GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
6. 9858, Kanada                    GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
7. B61, İspanya                    GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
8. BCR-1 Burdur, Turkiye           GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
9. BCR-2 Burdur, Turkiye           GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
10. BCR-3 Burdur, Turkiye          GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
11. BCR-4 Burdur, Turkiye          GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
12. BCR-5 Burdur, Turkiye          GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
13. BCR-6 Burdur, Turkiye          GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
14. BCR-7 Burdur, Turkiye          GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
15. BCR-8 Burdur, Turkiye          GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
16. BCR-9 Burdur, Turkiye          GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
17. BCR-10 Burdur, Turkiye         GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
18. Cp5, Avustralya                GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
19. Cp7, Avustralya                GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
20. NEV1 Nevsehir, Turkiye         GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
21. NEV2 Nevsehir, Turkiye         GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
22. NEV3 Nevsehir, Turkiye         GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
23. NEV4 Nevsehir, Turkiye         GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
24. NEV5 Nevsehir, Turkiye         GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
25. NEV6 Nevsehir, Turkiye         GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
26. Sakha207, Mısır                GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
27. TrKonCpar1, Konya              GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
28. TrKonCpar2, Konya              GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
29. TrKonCpar3, Konya              GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
30. TrKonCpar4, Konya              GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
31. TrKonCpar5, Konya              GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
32. TrKonCpar6, Konya              GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
33. TrKonCpar7, Konya              GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
34. TrKonCpar8, Konya              GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
35. TrKonCpar9, Konya              GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
36. TrKonCpar10, Konya             GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
37. WH16, Amerika                  GAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTAC
```

```
                                   440       450       460       470       480       490       500
1. 9817, Kanada                    ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
2. 9823, Kanada                    ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
3. 9837, Kanada                    ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
4. 9845, Kanada                    ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
5. 9854, Kanada                    ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
6. 9858, Kanada                    ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
7. B61, İspanya                    ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
8. BCR-1 Burdur, Turkiye           ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
9. BCR-2 Burdur, Turkiye           ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
10. BCR-3 Burdur, Turkiye          ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
11. BCR-4 Burdur, Turkiye          ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
12. BCR-5 Burdur, Turkiye          ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
13. BCR-6 Burdur, Turkiye          ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
14. BCR-7 Burdur, Turkiye          ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
15. BCR-8 Burdur, Turkiye          ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
16. BCR-9 Burdur, Turkiye          ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
17. BCR-10 Burdur, Turkiye         ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
18. Cp5, Avustralya                ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
19. Cp7, Avustralya                ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
20. NEV1 Nevsehir, Turkiye         ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
21. NEV2 Nevsehir, Turkiye         ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
22. NEV3 Nevsehir, Turkiye         ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
23. NEV4 Nevsehir, Turkiye         ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
24. NEV5 Nevsehir, Turkiye         ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
25. NEV6 Nevsehir, Turkiye         ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
26. Sakha207, Mısır                ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
27. TrKonCpar1, Konya              ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
28. TrKonCpar2, Konya              ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
29. TrKonCpar3, Konya              ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
30. TrKonCpar4, Konya              ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
31. TrKonCpar5, Konya              ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
32. TrKonCpar6, Konya              ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
33. TrKonCpar7, Konya              ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
34. TrKonCpar8, Konya              ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
35. TrKonCpar9, Konya              ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
36. TrKonCpar10, Konya             ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
37. WH16, Amerika                  ACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT

                                   510       520       530       540       550       560       570
1. 9817, Kanada                    GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
2. 9823, Kanada                    GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
3. 9837, Kanada                    GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
4. 9845, Kanada                    GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
5. 9854, Kanada                    GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
6. 9858, Kanada                    GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
7. B61, İspanya                    GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
8. BCR-1 Burdur, Turkiye           GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
9. BCR-2 Burdur, Turkiye           GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
10. BCR-3 Burdur, Turkiye          GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
11. BCR-4 Burdur, Turkiye          GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
12. BCR-5 Burdur, Turkiye          GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
13. BCR-6 Burdur, Turkiye          GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
14. BCR-7 Burdur, Turkiye          GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
15. BCR-8 Burdur, Turkiye          GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
16. BCR-9 Burdur, Turkiye          GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
17. BCR-10 Burdur, Turkiye         GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
18. Cp5, Avustralya                GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
19. Cp7, Avustralya                GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
20. NEV1 Nevsehir, Turkiye         GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
21. NEV2 Nevsehir, Turkiye         GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
22. NEV3 Nevsehir, Turkiye         GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
23. NEV4 Nevsehir, Turkiye         GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
24. NEV5 Nevsehir, Turkiye         GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
25. NEV6 Nevsehir, Turkiye         GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
26. Sakha207, Mısır                GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
27. TrKonCpar1, Konya              GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
28. TrKonCpar2, Konya              GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
29. TrKonCpar3, Konya              GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
30. TrKonCpar4, Konya              GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
31. TrKonCpar5, Konya              GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
32. TrKonCpar6, Konya              GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
33. TrKonCpar7, Konya              GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
34. TrKonCpar8, Konya              GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
35. TrKonCpar9, Konya              GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
36. TrKonCpar10, Konya             GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
37. WH16, Amerika                  GTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCTGCT
```

```
                                   580       590       600       610       620       630       640
1. 9817, Kanada                    AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
2. 9823, Kanada                    AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
3. 9837, Kanada                    AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
4. 9845, Kanada                    AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
5. 9854, Kanada                    AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
6. 9858, Kanada                    AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
7. B61, İspanya                    AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
8. BCR-1 Burdur, Turkiye           AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
9. BCR-2 Burdur, Turkiye           AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
10. BCR-3 Burdur, Turkiye          AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
11. BCR-4 Burdur, Turkiye          AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
12. BCR-5 Burdur, Turkiye          AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
13. BCR-6 Burdur, Turkiye          AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
14. BCR-7 Burdur, Turkiye          AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
15. BCR-8 Burdur, Turkiye          AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
16. BCR-9 Burdur, Turkiye          AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
17. BCR-10 Burdur, Turkiye         AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
18. Cp5, Avustralya                AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
19. Cp7, Avustralya                AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
20. NEV1 Nevsehir, Turkiye         AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
21. NEV2 Nevsehir, Turkiye         AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
22. NEV3 Nevsehir, Turkiye         AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
23. NEV4 Nevsehir, Turkiye         AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
24. NEV5 Nevsehir, Turkiye         AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
25. NEV6 Nevsehir, Turkiye         AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
26. Sakha207, Mısır                AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
27. TrKonCpar1, Konya              AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
28. TrKonCpar2, Konya              AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
29. TrKonCpar3, Konya              AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
30. TrKonCpar4, Konya              AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
31. TrKonCpar5, Konya              AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
32. TrKonCpar6, Konya              AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
33. TrKonCpar7, Konya              AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
34. TrKonCpar8, Konya              AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
35. TrKonCpar9, Konya              AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
36. TrKonCpar10, Konya             AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
37. WH16, Amerika                  AATTCAAGTAGTCCAACTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCA
                                   650       660       670       680       690       700       710       720
1. 9817, Kanada                    GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
2. 9823, Kanada                    GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
3. 9837, Kanada                    GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
4. 9845, Kanada                    GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
5. 9854, Kanada                    GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
6. 9858, Kanada                    GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
7. B61, İspanya                    GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
8. BCR-1 Burdur, Turkiye           GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
9. BCR-2 Burdur, Turkiye           GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
10. BCR-3 Burdur, Turkiye          GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
11. BCR-4 Burdur, Turkiye          GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
12. BCR-5 Burdur, Turkiye          GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
13. BCR-6 Burdur, Turkiye          GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
14. BCR-7 Burdur, Turkiye          GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
15. BCR-8 Burdur, Turkiye          GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
16. BCR-9 Burdur, Turkiye          GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
17. BCR-10 Burdur, Turkiye         GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
18. Cp5, Avustralya                GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
19. Cp7, Avustralya                GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
20. NEV1 Nevsehir, Turkiye         GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
21. NEV2 Nevsehir, Turkiye         GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
22. NEV3 Nevsehir, Turkiye         GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
23. NEV4 Nevsehir, Turkiye         GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
24. NEV5 Nevsehir, Turkiye         GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
25. NEV6 Nevsehir, Turkiye         GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
26. Sakha207, Mısır                GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
27. TrKonCpar1, Konya              GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
28. TrKonCpar2, Konya              GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
29. TrKonCpar3, Konya              GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
30. TrKonCpar4, Konya              GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
31. TrKonCpar5, Konya              GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
32. TrKonCpar6, Konya              GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
33. TrKonCpar7, Konya              GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
34. TrKonCpar8, Konya              GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
35. TrKonCpar9, Konya              GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
36. TrKonCpar10, Konya             GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
37. WH16, Amerika                  GAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAA
```

```
                                   730       740       750       760       770       780       790
1. 9817, Kanada                    GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
2. 9823, Kanada                    GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
3. 9837, Kanada                    GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
4. 9845, Kanada                    GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
5. 9854, Kanada                    GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
6. 9858, Kanada                    GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
7. B61, İspanya                    GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
8. BCR-1 Burdur, Turkiye           GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
9. BCR-2 Burdur, Turkiye           GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
10. BCR-3 Burdur, Turkiye          GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
11. BCR-4 Burdur, Turkiye          GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
12. BCR-5 Burdur, Turkiye          GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
13. BCR-6 Burdur, Turkiye          GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
14. BCR-7 Burdur, Turkiye          GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
15. BCR-8 Burdur, Turkiye          GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
16. BCR-9 Burdur, Turkiye          GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
17. BCR-10 Burdur, Turkiye         GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
18. Cp5, Avustralya                GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACCTTTT
19. Cp7, Avustralya                GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
20. NEV1 Nevsehir, Turkiye         GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
21. NEV2 Nevsehir, Turkiye         GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
22. NEV3 Nevsehir, Turkiye         GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
23. NEV4 Nevsehir, Turkiye         GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
24. NEV5 Nevsehir, Turkiye         GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
25. NEV6 Nevsehir, Turkiye         GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
26. Sakha207, Mısır                GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
27. TrKonCpar1, Konya              GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
28. TrKonCpar2, Konya              GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
29. TrKonCpar3, Konya              GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
30. TrKonCpar4, Konya              GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
31. TrKonCpar5, Konya              GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
32. TrKonCpar6, Konya              GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
33. TrKonCpar7, Konya              GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
34. TrKonCpar8, Konya              GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
35. TrKonCpar9, Konya              GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
36. TrKonCpar10, Konya             GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
37. WH16, Amerika                  GTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACC TTT
                                            800       810       820       830       840       850       860
1. 9817, Kanada                    CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
2. 9823, Kanada                    CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
3. 9837, Kanada                    CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
4. 9845, Kanada                    CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
5. 9854, Kanada                    CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
6. 9858, Kanada                    CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
7. B61, İspanya                    CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGAT
8. BCR-1 Burdur, Turkiye           CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
9. BCR-2 Burdur, Turkiye           CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
10. BCR-3 Burdur, Turkiye          CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
11. BCR-4 Burdur, Turkiye          CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
12. BCR-5 Burdur, Turkiye          CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
13. BCR-6 Burdur, Turkiye          CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
14. BCR-7 Burdur, Turkiye          CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
15. BCR-8 Burdur, Turkiye          CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
16. BCR-9 Burdur, Turkiye          CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
17. BCR-10 Burdur, Turkiye         CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
18. Cp5, Avustralya                CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATG
19. Cp7, Avustralya                CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
20. NEV1 Nevsehir, Turkiye         CTATACCGGCGCAAATAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
21. NEV2 Nevsehir, Turkiye         CTATACCGGCGCAAATAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGG
22. NEV3 Nevsehir, Turkiye         CTATACCGGCGCAAATAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGG
23. NEV4 Nevsehir, Turkiye         CTATACCGGCGCA
24. NEV5 Nevsehir, Turkiye         CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGA
25. NEV6 Nevsehir, Turkiye         CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGA
26. Sakha207, Mısır                CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
27. TrKonCpar1, Konya              CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGA
28. TrKonCpar2, Konya              CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
29. TrKonCpar3, Konya              CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
30. TrKonCpar4, Konya              CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
31. TrKonCpar5, Konya              CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
32. TrKonCpar6, Konya              CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
33. TrKonCpar7, Konya              CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
34. TrKonCpar8, Konya              CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
35. TrKonCpar9, Konya              CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
36. TrKonCpar10, Konya             CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAA
37. WH16, Amerika                  CTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATG
```



Şekil 4.25. Konya yöresinde buzağılarda belirlenen *C. parvum* alt genotiplerine ait izolatlar ile Türkiye ve Dünyadaki diğer bazı *C. parvum* alt genotiplerine ait izolatlarının GP60 gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları

Şekil 4.25'de görüldüğü üzere GP60 gen bölgesine göre saptanan *C. parvum* alt genotiplerine ait izolatlarla kıyaslamaya dahil edilen diğer *C. parvum* alt genotiplerine ait izolatlar arasında çeşitli nükleotid değişimleri, delesyonları ve insertionları belirlenmiştir. *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipi belirlenen izolatların (TrKonCpar1- TrKonCpar10) pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında ve alignmenta dahil edilen IIaA13G2R1 alt genotipindeki 9854 izolatıyla (buzağı, Kanada) %100 identik oldukları tespit edilmiştir. *C. parvum* IIaA13G2R1 izolatlarının, IIaA13G1R1, IIaA16G2R1, IIaA16G3R1, IIaA16G1R1, IIaA17G2R1, IIaA18G3R1ve IIaA19G3R1 izolatları ile aralarında %0,1; IIaA14G1R1 ve IIaA16G3R2 izolatları ile %0,4 ve IIaA20G3R1 izolatı ile de %0,2 oranında farklılık bulunduğu saptanmıştır. Konya yöresinde buzağılarda saptanan *C. parvum* alt genotiplerine ait izolatlar ile Türkiye ve Dünyadan diğer alt genotiplere dahil bazı izolatların Neighbor Joining Metodu (Kimura Two Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.26'de verilmiştir. Filogenetik ağaçta da görüleceği üzere araştırma yöresinde buzağılarda saptanan *C. parvum* IIaA13G2R1 alt genotipine ait izolatların alt genotip bazlı olarak kendi gruplarında yer aldığı saptanmıştır.

Şekil 4.26. Buzağılarda belirlenen *C. parvum* alt genotiplerine ait izolatlar ile GenBank'a kayıtlı buzağılardaki diğer bazı alt genotiplere ait izolatların GP60 gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Neighbour Joining – Kimura Two Parameter modeli).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Zoonotik enfeksiyonların epidemiyolojisinde evcil hayvanların rolü çok önemlidir. Evcil hayvanlarda intestinal protozoonlar içerisinde zoonotik karakterli *Cryptosporidium* türleri de oldukça yaygın olup, özellikle buzağılarda ekonomik kayıplara neden olmaktadırlar.

Apicomplexan parazitlerden olan *Cryptosporidium* türleri, insan dâhil birçok omurgalı türünü enfekte edebilmekte ve hastalık oluşturabilmektedirler (77,108). Sığır cryptosporidiosis'i yeni doğan buzağı ishallerinde primer etkenlerden biri olup sulu yeşil renkte ishal, progresif dehidrasyon ve ölümlere yol açmaktadır. Buna karşılık hastalık yaşını doldurmuş düvelerde ve ergin sığırlarda daha çok asemptomatik seyretmektedir (109). Dünya çapında yapılan birçok moleküler epidemiyolojik çalışma, memeliler içerisinde en çok sığırların yaygın olarak *Cryptosporidium* türleriyle enfekte olduğunu ortaya koymuştur (77). Günümüze kadar otuzun üzerinde *Cryptosporidium* türü klasifiye edilmesine karşın sığırlar genellikle *C. parvum, C. andersoni, C. bovis* ve önceden *Cryptosporidium* deer-like genotipi olarak bilinen *C. ryanae* ile enfekte olmaktadırlar (83,108). Doğal enfeksiyonlarda diğer 3 *Cryptosporidium* türü (*C. felis, C. meleagridis* ve *C. suis*) ve iki genotipinin (*Cryptosporidium suis-like* ve *Cryptosporidium pig* genotype) de nadiren sığırlarda bulunabildiği bildirilmiştir (77,83,110).

Cryptosporidium türleri, birçok hayvan türünü enfekte edebilmenin yanında, dışkı ile dış ortama fazla miktarda oocyst formda atılma yeteneğine sahiptirler. Dolayısıyla cryptosporidiosis, insan ve hayvan türlerinde insanlar arasında direkt temas (insandan insana bulaşma), hayvan insan teması (zoonotik bulaşma), kontamine gıdaların alınması (food-borne bulaşma) ve kontamine suların içilmesi (water-borne bulaşma) gibi çeşitli bulaşma dinamiklerini gösterir. Bu bulaşma dinamiklerinin cryptosporidiosis'in epidemiyolojisindeki rölatif önemleri, öncelikle geleneksel teşhis yöntemleriyle parazit kaynağının ayırt edilememesi ve epidemiyolojik araştırma maliyetlerinin yüksekliği sebebiyle kapsamlı çalışmaların yetersizliği gibi faktörlere bağlı olarak henüz tam açıklığa kavuşturulamamıştır. Bununla birlikte son on yıl içerisinde *Cryptosporidium* türlerinin teşhisine, tür/genotip ve alttiplerinin ayırt edilmesine yönelik çeşitli moleküler biyolojik teknikler geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Günümüzde cryptosporidiosis'in endemik ve epidemik olduğu bölgelerdeki epidemiyolojik çalışmalarda bu teknikler artan bir ivme ile yaygın olarak kullanılmaya başlanmış olup cryptosporidiosis'in insan ve hayvanlar arasındaki bulaşma yolları hakkındaki bilgileri önemli derecede artırmıştır (77).

Dünya'da buzağılarda *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonları ile ilgili çalışmalara 1970'li yıllarda başlanmasına karşın (111), Türkiye'de *Cryptosporidum* spp. oocystleri ilk olarak 1984 yılında buzağılarda bildirilmiştir (13). Daha sonra yapılan çalışmalarda (44,111-113) cryptosporidiosis'in buzağı, kuzu ve oğlak gibi genç hayvanlarda ciddi sorunlara neden olduğu kaydedilmiş ve *Cryptosporidium* spp. oocystlerinin prevalansında sürü büyüklüğü, yetiştirme tipi, doğum zamanı ve sütten kesme gibi risk faktörlerinin etkili olduğu bildirilmiştir.

C. parvum özellikle yeni doğan buzağılarda ince bağırsakları enfekte eder ve şiddetli ishalle seyreden hastalık tablosuna yol açarken; *C. andersoni*, genç ve ergin sığırlarda abomasuma yerleşim gösterir ve süt üretiminde azalmaya yol açar (92,114). Diğer yandan *C. bovis* ve *C. ryanae* enfeksiyonlarının ise asemptomatik seyir gösterdiği kaydedilmiştir (115, 116). Bu türler arasında *C. parvum*'un global olarak neden olduğu water-borne ve food-borne salgınları rapor edilmiştir (117-119).

Türkiye'de günümüze kadar sığırlarda cryptosporidiosis üzerine çalışmaların daha çok konvansiyonel parazitolojik yöntemlerle yapıldığı görülmekte olup moleküler prevalans ve tiplendirme çalışmalarının eksikliği dikkati çekmiştir. Değişik coğrafik yapı ve mevsime ait farklı bölgelerde konvansiyonel yöntemlerle yapılan mikroskobik çalışmalarda buzağılarda *Cryptosporidium* spp. oocystlerine, Karacabey harasında %26,7 (13), Elazığ'da %7,2-11,5 (15,120), Aydın'da %10,7 (16), Kars'ta %25,7-%38,8 (12,14,19,121); Konya'da %27,33-%63,9 (24,122); Sivas'ta %31,4-70,3 (21), Ankara'da %20,2-69,2 (17,18,123), Hakkari'de %22,1 (22), Van'da %8,1-%18,6 (22,23,124) ve Erzurum'da %22,8 (14) oranlarında rastlanıldığı rapor edilmiştir.

Türkiye'de cryptosporidiosis üzerine yapılan sınırlı sayıda moleküler çalışma yapılmıştır. *C. parvum* tip 1 ve tip 2 genotiplerinin spesifik real-time PCR ve PCR-RFLP teknikleri ile dünyanın farklı bölgelerinden insan ve buzağılardan elde edilmiş izolatlar ile deneysel laboratuar izolatlarında araştırıldığı bir çalışmada (28) Kars ilindeki buzağılardan elde edilmiş 15 izolatın her iki teknik ile de tip 2 genotipi olduğu ortaya konmuştur. Takiben *C. parvum*'un Kars'ta buzağılardan izole edilmiş 15 izolat ile İsrail'de yine buzağılardan izole edilmiş 61 izolatta multiple polymorphic genetik markerlar kullanarak genotipleri araştırılmış (29) ve iki farklı bölgede sığır yetiştiriciliğinin parazit popülasyonun yapısı üzerine etkisi karşılaştırılarak Kars yöresinde daha çok ticarete dayalı çiftlikler arasında sık hayvan nakilleri olmasının parazitin bulaşması ve yayılmasında önemli epidemiyolojik bir dinamik olduğu

buna karşın böyle bir risk faktörünün İsrail'de bulunmadığı rapor edilmiştir (29). Aynı çalışmada (29) ayrıca her iki ülke için farklı multilocus genotiplerin bireysel olarak işletmelerde sınırlı kaldığı belirlenmiş, çiftlik başına düşen genotip ve miks izolat sayısının Türkiye'de daha yaygın olduğu saptanmıştır. Öte yandan İzmirde toplam 707 çocuk üzerinde yürütülen diğer bir çalışmada (30), acid-fast ve phenol-auramine boyama yöntemleriyle toplam 4 dışkıda *Cryptosporidium* spp. pozitifliği belirlenmiş ve elde edilen bu izolatların PCR ve RFLP yöntemleriyle analizi sonucunda zoonotik *C. parvum* genotip 2'ye ait oldukları saptanmıştır. Aydın'da toplam 120 ishalli buzağıda PCR-RFLP sonucu *C. parvum* moleküler prevalansının %24,2 olduğu rapor edilmiştir (31). Sungur ve ark. (26), hastanelere ishal şikayeti ile başvuran 18 çocuk ve yine ishal tablosuna sahip olan 27 buzağı dışkısı olmak üzere toplam 45 örneği Nested PCR ile incelemişler, buzağı dışkılarının 8 (%29,7)'inde, çocuk dışkılarının 1 (%5,6)'inde olmak üzere toplam 9 (%20) örnekte *Cryptosporidum* spp. pozitifliği saptamışlardır. Öte yandan Dirim Erdoğan ve ark. (125), cryptosporidiosis tanısında taze ve formaldehitle saklanmış dışkı örneklerinde PCR yönteminin etkinliğini araştırmak amacıyla, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Polikliniğine başvuran ve dışkı incelemeleri sonucunda *Cryptosporidium* spp. oocystleri saptanan 22 hastaya ait 23'ü taze, 10'u ise %10 formaldehit içinde saklanmış toplam 33 dışkı örneğini nested-PCR yöntemi ile incelemişler ve bu yöntemin taze dışkılarda sensitivite ve spesifitesini %100; formaldehitde saklanan dışkı örneklerinin sensitivitesini ise %50 olarak belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada, Sakarya ve ark. (27), Ankara'nın değişik hastanelerine ishal şikayeti ile başvuran 98 hastadan ve yine Ankara'da bulunan değişik sığırcılık işletmelerindeki 32 buzağıdan alınan toplam 130 dışkı örneğinin Nested PCR incelemesi sonucu buzağılarda %37,5 insanlarda ise %1,02 oranında *Cryptosporidium* spp. pozitifliği tespit etmişlerdir.

Son yıllarda Nevşehir yöresinde buzağılarda Real Time PCR ile yapılan bir çalışmada (33) *C. parvum* ve *Cryptosporidium* sp. pozitifliği belirlenen örnekler, 18S rRNA gen bölgesi yönünden Nested PCR analizine tabii tutulmuş ve DNA bant profili ve konsantrasyonu uygun olan *C. parvum* için 6 ve *Cryptosporidium* sp. için ise 3 örneğin sekans analizleri ve GenBank kayıtları (JN245616-25) gerçekleştirilmiştir. Aynı çalışmada (33), moleküler filogenetik analizler sonucu, sekanslanan 3 *Cryptosporidium* sp. izolatının 2'sinin *C. ryanae*, 1'inin *C. bovis* olduğu ortaya konmuş ve Türkiye'den ilk bildirim olarak GenBank kayıtları yapılmıştır. Aynı yörede Real Time PCR ile incelemesi yapılan 150 buzağının %20,7'sinin cryptosporidiosis yönünden pozitif bulunduğu bir çalışmada (32), pozitif belirlenen

örneklerde *C. parvum* ve *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonlarının ayırıcı teşhisi yapılmış ve *C. parvum* prevalansı %15,3, *Cryptosporidium* spp. prevalansı ise %5,3 olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada (32), araştırma yöresindeki primer yaygınlık gösteren türün *C. parvum* olduğu saptanmıştır.

Takiben Burdur ve yöresinde cryptosporidiosis yönünden TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizleriyle incelemesi yapılan sığırların %37,2'si pozitif bulunmuş, *C. parvum* prevalansı ≤2 ay yaş grubunda %52,5, ≥6 ay yaş grubunda %3,8, toplamda ise %27,2; *Cryptosporidium* spp. prevalansı ≤2 ay grubunda %5,0, ≥6 ay yaş grubunda %14,6, toplamda ise %10,0 olarak saptanmıştır (35). Aynı çalışmada (35) pozitif belirlenen izolatların SSU rRNA gen bölgesinin Nested PCR ile analizleri sonucunda toplam 61 *C. parvum* ve 15 *Cryptosporidium* spp. pozitif izolatın VspI, SspI ve MboII restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı RFLP tekniği ile analizleri sonucunda, *C. parvum* izolatlarının her üç enzimle de tür spesifik bant profilleri sergilediği, 15 *Cryptosporidium* spp. pozitif izolatın ise 10'unun *C. ryanae*, 5'inin ise *C. bovis* ile identik bant profilleri gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca çalışmada (35), Real Time PCR analizleri ve RFLP tekniği ile *C. parvum* belirlenen toplam 6 (CpB1-CpB6), *C. ryanae* belirlenen toplam 3 (CrB1-CrB3) ve *C. bovis* belirlenen toplam 2 (CbB1, CbB2) izolatın SSU-rRNA gen bölgeleri sekanslanarak uygulanan tekniklerin konfirmasyonu ve izolatların moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. Güven ve ark. (34) Erzurum yöresinde bir aydan küçük 307 buzağıda Nested PCR ile cryptosporidiosis prevalansını %3,9 olarak belirlemişler ve SSU rRNA gen bölgesi hedef alınarak yapılan DNA dizi analizleri sonuçlarına göre de PCR pozitif örneklerin *C. parvum* olduğunu saptamışlardır.

Bu çalışmada Konya yöresinde buzağılarda TaqMan prob bazlı Real Time PCR ile cryptosporidiosis için saptanan moleküler prevalans, Türkiye'de sığır cryptosporidiosis'i üzerine konvansiyonel tekniklerle yapılmış diğer bazı çalışmaları (12,14,17,21,121) doğrularken, daha önce yapılmış olan diğer bazı moleküler araştırma sonucuyla (27,35) da paralel bulunmuştur. Çalışmada spesifik primer ve probların kullanıldığı Real Time PCR tekniği ile pozitif belirlenen örneklerin tümünün *C. parvum* olduğu belirlenmiş yalnız *Cryptosporidium* spp. pozitifliği saptanmamıştır. Bu şekilde araştırma yöresinde buzağılarda *C. parvum* moleküler prevalansı %53,6 olarak tespit edilmiştir. Real Time PCR analizleri ile *C. parvum* pozitif belirlenen toplam 104 izolatın SSU rRNA gen bölgesinin Nested PCR ile analizleri sonucunda toplam 84 örneğin jel üzerinde amplifikasyon gösterdiği görülmüştür. Olası miks enfeksiyonların belirlenebilmesi için bu izolatlara ait amplikonlar VspI, SspI ve

MboII restriksiyon enzimleri ile RFLP analizlerine tabii tutulmuştur. RFLP analizleri sonucunda, tüm pozitif izolatlarının her üç enzimle de tür *C. parvum* tür spesifik bant profilleri sergilediği ortaya konmuş, *C. ryanae*, *C. bovis* ve *C. andersoni* ile miks enfeksiyonlara rastlanmamıştır. *C. parvum*, *C. bovis* ve *C. ryanae* türlerinin VspI ve SspI restriksiyon enzimleri ile RFLP bant profillerinde çok küçük farklılıklar olmasından dolayı bu türlerin kesin ayrımı, PCR ürünlerinin DNA sekanslarının ortaya konmasını gerektirdiği ileri sürülmüşse (6,115) de Feng ve ark. (83)'nın MboII restriksiyon enzimini bu türlerin RFLP analizlerine adapte etmesiyle birlikte *C. parvum* / *C. andersoni*, *C. bovis* ve *C. ryanae* türlerinin kolaylıkla ayrılabildiği ortaya konmuştur. Bu çalışmada da Feng ve ark. (83)'nın belirttiği şekilde *Cryptosporidium* türlerinin ayırımı amacıyla VspI, SspI ve MboII restrüksiyon enzimleri müşterek olarak kullanılmış ve Real Time PCR'da *C. parvum* parvum belirlenen örneklerin tür spesifik bant profilleri sergilediği ve miks enfeksiyonların bulunmadığı ortaya konmuştur.

Cryptosporidium türleri ve genotiplerinin ortaya konmasında en çok kullanılan gen bölgelerinin başında small subunit ribosomal RNA (SSU-rRNA) geni gelmektedir. SSU-rRNA gen bölgesinin genotiplemede yaygın olarak kullanılması, genel olarak bu gen bölgesinin çoklu-kopya yapısında (multi-copy nature) olmasından ve kısmi-korunmuş (semi-conserved) ve yüksek değişken (hyper-variable) bölgeler içermesinden ileri geldiği kaydedilmiştir (77). Bu çalışmada da Real Time PCR analizleri ve RFLP tekniği ile *C. parvum* belirlenen toplam 3 (TrKonCpar5, TrKonCpar6, TrKonCpar10) izolatın SSU-rRNA gen bölgeleri söz konusu tekniklerin konfirmasyonu ve filogenetik analizler için sekanslanmıştır. *C. parvum* belirlenen Konya izolatlarının (TrKonCpar5, TrKonCpar6, TrKonCpar10) pairwise kıyaslamalarına göre kendi aralarında %100 identik oldukları, Türkiye'de *C. parvum* Nevsehir izolatlarıyla (33) %0,3±0,1, Burdur izolatlarıyla (35) ise %0,3±0,2 farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. *C. parvum* Konya izolatlarının ayrıca Hindistan'da buzağıdan elde edilmiş Izatnagar izolatıyla (GenBank: EF611871) %100 identik olduğu, Amerika'da yine buzağıdan izole edilmiş Tulare Daily izolatıyla (GenBank: FJ752165) ise %0,4 genetik farklılık gösterdiği saptanmıştır. Diğer yandan Nevşehir ve Burdur yöresinde buzağılarda 18S rRNA gen bölgesinin sekans analizleri ile konfirme edilen *C. bovis* ve *C. ryanae* türleri (33,35) Konya yöresinde incelenen buzağılarda tespit edilmemiştir. Daha çok ergin sığırlarda yaygın olarak bildirilen *C. andersoni*'ye bu çalışmada rastlanılamamıştır. Bu durumun incelenen buzağıların 2 aylığa kadar olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Söz konusu parazit türünün Türkiye'deki durumu

hakkında ergin sığırlarda kapsamlı moleküler araştırmaların yapılmasıyla daha açık verilerin ortaya konabileceği düşünülmektedir.

Cryptosporidiosis tanısı, genellikle konvansiyonel olarak dışkı örneklerinde aside dirençli parazitleri saptayan Kinyoun acid-fast, Carbol fuchsin veya Ziehl- Neelsen gibi çeşitli boyama yöntemleriyle 4-6 µm çapındaki oocystlerin görülmesiyle konulmaktadır (2). *Cryptosporidium* dışında *Isospora* ve *Cyclospora* gibi fırsatçı parazitleri de saptayan bu yöntemler, laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmakla birlikte sensitiviteleri düşüktür. Boya almayan oocystler nedeniyle özellikle az sayıda oocyst içeren dışkılarda yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir (126). *Cryptosporidium* türlerini klinik olgulardan, dışkı ile çok az miktarda oocyst atan rezervuar konaklardan ve çevresel kaynaklardan izole etmek amacıyla moleküler tanı yöntemleri son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmış (71,72), hatta teşhiste kalite ve kantiteyi arttırmaya yönelik olarak Real Time PCR, çeşitli spesifik gen bölgelerini hedef alan Nested PCR gibi pek çok yeni moleküler teknikler geliştirilmiştir (72-75,127,128). Konvansiyonel boyama yöntemleriyle elde edilen pozitiflikler, tür ve genotip düzeyinde identifikasyona olanak vermemekte (76), buna karşın moleküler olarak yapılabilen genotipleme sayesinde *Cryptosporidium* spp. pozitiflikleri filogenetik olarak karakterize edilebilmekte ve enfeksiyonun orijini ortaya konulabilmektedir. Bunun yanında moleküler karakterizasyon sayesinde *Cryptosporidium* türlerinin farklı suşları arasındaki genetik varyasyonların ortaya konması ile coğrafik bölgeler arasındaki ilişkiler de araştırılabilmektedir (77). Real-time PCR tekniği, hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle son yıllarda öne çıkan tekniklerin başında gelmektedir. Ayrıca bu teknik ile mutasyon analizleri ve gen ekspresyonları da hassas bir şekilde belirlenebilmektedir. Son yıllarda cryptosporidiosis'in tür spesifik teşhisinde de kullanılmaya başlanan Real Time PCR tekniğinde, ribozomal ve mitokondriyal çeşitli gen bölgelerini hedef alarak spesifik primer ve problar ile araştırmaların yapıldığı dikkati çekmektedir (33,35,75,127,128). Real Time PCR tekniği sahip olduğu yüksek sensitivite ve spesifitenin yanında kantitafif analize olanak sağlaması, kontaminasyon riskinin çok daha düşük olması ve hızlı sonuç vermesi gibi çeşitli özellikleri ile konvansiyonel PCR, nested PCR ve antijen veya monoklonal antikor tabanlı ELISA gibi çeşitli tekniklere göre üstün bir teknik olarak kullanılmıştır (75,78,79,127,128). Bu çalışmada da söz konusu avantajları nedeniyle araştırma yöresinde sığırlarda cryptosporidiosis'in durumunu net olarak ortaya koyabilmek amacıyla, *C. parvum* tür spesifik polimorfik fakat işlevi bilinmeyen (100; GenBank Aksesyon numarası:

AF190627) ve *Cryptosporidium* soy spesifik 18S rRNA (ribozomal RNA) gen bölgelerini hedef alan spesifik primer ve TaqMan problar kullanılarak Real Time PCR tekniği temel teşhis yöntemi olarak kullanılmıştır. Söz konusu teknik ile eş zamanlı olarak *C. parvum* ve *Cryptosporidium* spp. pozitiflikleri spesifik bir şekilde ortaya konmuş, Ct (dR) değerleri belirlenerek örneklerdeki parazitemi hakkında veriler elde edilmiştir. Cryptosporidiosis yönünden Modifiye-Ziehl-Neelsen boyama sonuçlarının Real Time PCR sonuçları ile karşılaştırmasında; mikroskobi pozitif 92 örneğin TaqMan Real Time PCR analizleriyle 78'i *C. parvum* pozitif, 14'ü ise negatif olarak belirlenmiştir. Mikroskobi negatif 102 örneğin ise TaqMan Real Time PCR analizleriyle 27'i *C. parvum* pozitif ve 75'i de negatif olarak saptanmıştır. Mikroskobik teşhisin Real Time PCR tekniği ile kıyaslanması sonucu %75,0 sensitivite ve %84,4 spesifite gösterdiği görülmüştür. Kappa testi ile Real Time PCR ve mikroskobik teşhis arasında ($p<0,01$) uyum saptanmıştır. Benzer şekilde Kappa testi ile iki test arasındaki uyum da düşük saptanmıştır (%58,9; $p<0,01$). Nested PCR sonuçlarının Real Time PCR sonuçları ile karşılaştırmasında ise Nested PCR pozitif 84 örneğin TaqMan Real Time PCR analizleriyle de tümü *Cryptosporidium* pozitif olarak saptanırken Nested PCR negatif 110 örneğin 20'si TaqMan Real Time PCR analizleriyle pozitif, 90'ı da negatif olarak bulunmuştur. Nested PCR'ın Real Time PCR tekniği ile kıyaslanması sonucu yine düşük sensitivite (%80,8) belirlenirken, her iki yöntem için de spesifite %100,0 olarak saptanmıştır. Kappa testi ile Real Time PCR ve Nested PCR tetsleri arasındaki uyum mikroskobi sonuçlarına göre daha yüksek (%79,6; $p<0,01$) tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar bazı çalışmaların (35,76,126-128) sonuçları ile paralellik göstermiştir. Bu çalışmalardan, De Waele ve ark. (127), cryptosporidiosis'li 82 buzağıdan 1, 2, 3 ve 4. haftalıkken dışkı örnekleri almışlar ve hazırladıkları sürme preparatları phenol-auramine O boyası ve fluorescein isothiocyanate (FITC)-konjugeli anti-*Cryptosporidium* monoklonal antikorları ile muamele ettikten sonra mikroskobik analize tabii tutmuşlardır. Araştırıcılar (127) aynı haftalarda dışkı örneklerinden genomik DNA ekstraksiyonu yaparak örnekleri Nested PCR ve TaqMan Real Time PCR yöntemleri ile de analize tabii tutmuşlar ve yöntemler arasındaki farklılıkları incelemişlerdir. Çalışmada (127) Real Time PCR tekniği sensitivitesi (%89-95) ve spesifitesi (%89-100) en yüksek teknik belirlenirken, Nested PCR yönteminde sensitivite (%54-87) ve spesifite (%76-79) daha düşük saptanmıştır. Buna karşın çalışmada (127) mikroskobik teşhis yöntemleri en az sensitivite ve spesifiteye sahip bulunmuş olup, yalnızca fazla miktarda oocyst çıkarımının olduğu 2 haftalık buzağılarda orta düzeyde etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Yıldırım ve ark. (35), Carbol fuchsin boyamayla mikroskobik teşhis ve Nested

PCR yönteminin Real Time PCR tekniği ile kıyaslanması sonucunda daha düşük sensitivite gösterdiğini, ayrıca mikroskobik teşhiste spesifitenin yine düşük belirlenmesine karşın Nested PCR yönteminin %100 spesifiteye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Benzer olarak bu çalışmada da Real Time PCR tekniğinin gold test alınarak hesaplanan sensitivite ve spesifite oranları dikkate alındığında mikroskobik boyama yönteminin teşhis için yetersiz bir teknik olduğu görülmüş olmakla birlikte DeWaele ve ark. (127)'nın bulgularına benzer olarak özellikle düşük oocyst yüküne sahip hayvanlarda yalancı pozitifliklerin ortaya çıktığı dikkati çekmiştir. Buna karşın Nested PCR yönteminin sensitivitesi Real Time PCR tekniğine oranla düşük belirlenmesine karşın mikroskobik teşhisten daha yüksek olduğu, spesifitesinin ise %100 olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında Real Time PCR'da pozitif belirlenen ve Ct (dR) değerleri yüksek olan (≥34) örneklerin Nested PCR analizleri sonrası agaroz jel üzerinde amplifikasyon belirlenememiş veya çok silik bantlar tarzında ortaya çıktığı görülmüş olup bu izolatlar üzerine RFLP ve sekanslama analizlerinin yapılması mümkün olmamıştır. Bu açıdan çeşitli araştırıcıların da belirttiği gibi parazitin biyolojik döngüsünde devamlılığı sağlayan ve genç popülasyonlara hastalığın geçmesinde primer öneme sahip olan özellikle düşük parazitemiye sahip rezervuarların belirlenmesinde Real Time PCR tekniğinin çok daha güvenilir bir yöntem olarak ortaya çıktığı görülmüştür.

Alt genotiplendirme araçları, *C. hominis*'in insanlarda, *C. parvum*'un ise insan ve hayvanlar arasında bulaşma dinamiklerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu araçlar arasında 60 kDa glycoprotein geninin (GP60; GP40/15) sekans analizi *Cryptosporidium* genomunda polymorfik markerların başında gelmekte olup *C. parvum* ve *C. hominis* genotipleri ve alt genotiplerinin ortaya konmasında esas rolü üstlenmektedir (77,81). GP60 geni, bir microsatellite dizilimine benzer tarzda olup bu genin 5' ucunda serine-kodlayan TCA, TCG veya TCT trinucleotidlerinin sıralı tekrarlarını içerir. Ancak, bu üçlü nükleotid tekrarlarının sayısındaki varyasyonların yanısıra tekrar etmeyen bölgelerde de fazla miktarda sekans farklılıkları görülmektedir. Bu farklılıklar da *C. parvum* ve *C. hominis*'i çeşitli alt tip familyalarına kategorize etmektedir. Her bir alt tip familyasında, alt tipler çoğunlukla birbirlerinden trinucleotid tekrarlarının sayısı ile ayrılmaktadır. GP60 alt tiplerinin isimlendirilmesi altip familyasının gösterilmesi ile başlar (*C. hominis* için Ia, Ib, Id, Ie, If, vb.; *C. parvum* için IIa, IIb, IIc, IId, vb.). Bu isimlendirmeyi TCA (A harf ile gösterilir), TCG (G harfi ile gösterilir) veya TCT (T harfi ile gösterilir) tekrarları izler (129). *C. parvum* IIa alt tip familyasında trinucleotid tekrarlarından hemen sonra tek "ACATCA" sekansı geliyorsa "R1", iki kopya halinde geliyorsa "R2" olarak gösterilmektedir. GP60 geninin sekans analizi,

sekans heterojenitesi göstermesi ve parazit biyolojisi ile ilişkili olduğundan *Cryptosporidium* alt tiplendirmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu gen bölgesi *Cryptosporidium* genomunda şimdiye kadar identifiye edilen tek polimorfik markerdır (130,131). Genellikle fonksiyonel olmayan diğer alt tiplendirme hedeflerinden (double stranded RNA, internal transcribed spacer-2 ve traditional microsatellites ve minisatellites) farklı olarak, GP60 gen bölgesi parazitin invazif dönemlerinin apical bölgelerinin yüzeyinde lokalize olur, insan ve hayvanlardaki antikor yanıtının nötralize edilmesindeki dominant hedef bölgedir (132). Genin bu özelliğinden dolayı, parazitin biyolojik karakteri ve klinik semptomlarla, alt tip familya identifikasyonu arasında ilişki kurulması mümkündür. Şu ana kadar *C. parvum* içerisinde 2'si zoonotik karakterli (IIa, IId), 10'u da zoonotik karakterli olmayan (IIb, IIc, IIe-IIl) alt tip familyası belirlenmiştir (1,2,4-6,9). IIa ve IId alt genotiplerinin İspanya gibi yaygın görüldüğü bölgelerde, IIa alt tiplerinin tercihen buzağıları, IId alt tipinin ise kuzu ve oğlakları enfekte ettiği saptanmıştır (133,134). Özellikle IIc başta olmak üzere diğer *C. parvum* alt genotip familyaları şimdiye kadar yalnızca insanlarda bulunmuştur (4). *C. parvum* IIa alt tipinin dünyada buzağılardaki en yaygın alt genotip olduğu rapor edilmiştir. Özellikle IIa alt tipi, ABD, Kanada, İngiltere, İrlanda, İsveç, Almanya, Belçika, Hollanda, İtalya, İspanya, Portekiz, Macaristan, Sırbistan, Karadağ, Slovenya, Japonya, Hindistan, Avustralya ve Yeni Zellanda gibi ülkelerdeki sığırlardan yaygın olarak kaydedilmiştir (77,135). IIa alt genotipleri arasında IIaA15G2R1 alt genotipi buzağılardaki en yaygın alt tip olarak bildirilmiş ve ayrıca bu ülkelerdeki insan olgularından da yaygın olarak identifiye edilmiştir. Buna karşın IId ve IIl gibi alt tip familyaları yaygın olmayıp İspanya, Portekiz, Belçika, Hollanda, İsveç, Almanya, Macaristan, Slovenya, Sırbistan ve Karadağ gibi ülkelerde sınırlı sayıda sığır vakası bildirilmiştir (135). Türkiye'de şimdiye kadar sığırlarda *C. parvum* alt genotiplemesine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (35-37). Bu çalışmalardan, Yildirim ve ark. (36), Nevşehir yöresinde ishalli buzağılarda 6 *C. parvum* izolatının GP60 gen bölgesinin analizi sonucunda, 3'ünün IIaA13G2R1 ve diğer 3'ünün ise IIaA14G1R1 alt genotipine ait olduğunu kaydetmişlerdir. Arslan ve İtik Ekinci (37) Kars yöresinde 10 sığırda IIaA15G2R1, 2 sığırda IIaA16G3R1 ve 1 sığırda da IIdA15G1 alt genotiplerinin varlığını bildirmişlerdir. Burdur yöresinde sığırlarda *C. parvum* belirlenen toplam 10 izolatın (BCR-1-BCR-10) GP60 gen sekans analizleri sonucunda hepsinin IIaA13G2R1 alt genotip familyasında yer aldığı belirlenmiştir (35). Bu araştırmada da Konya yöresinde buzağılardan elde edilen *C. parvum* izolatlarının (TrKonCpar1- TrKonCpar10) GP60 gen sekans analizleri sonuçlarına göre IIaA13G2R1 alt genotip familyasında bulunduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların pairwise

kıyaslamalarına göre kendi aralarında ve alignmenta dahil edilen IIaA13G2R1 alt genotipindeki 9854 izolatıyla (buzağı, Kanada) %100 identik oldukları görülmüştür. IIaA15G2R1 en yaygın alt genotip olarak bilinmesine ve Kars yöresi sığırlarında da yaygın bulunmasına karşın bu çalışmada bu alt genotipe rastlanmamıştır. Ayrıca GenBank kayıtları incelendiğinde zoonotik IIa familyasında yer alan bu alt genotipin yalnızca Nevşehir yöresinden üç buzağıda (JQ034314-16), Konya yöresinden 10 buzağıda (JX826593-602) Kanada'dan bir buzağıda (DQ192502), Hollanda'dan bir sığırda (EF576971) ve ABD'den bir insanda (JX575601) rapor edildiği görülmektedir. Dünyada çok yaygın görülmeyen bu zoonotik alt genotipin Burdur, Nevşehir ve Konya yöresinde buzağılarda primer yaygınlık gösteren alt genotip bulunması, Türkiye'de bu alt genotip familyasının yaygın ve insan enfeksiyonlarında da sorumlu olabileceğini düşündürmüştür. Bu açıdan araştırmamızla bu alt genotipin bulaşma dinamikleri ve zoonotik potansiyeli üzerine kapsamlı epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç olduğu ortaya çıkmıştır.

Cryptosporidiosis prevalansını etkileyen risk faktörlerinin başında hayvanların yaşı gelmektedir. Cryptosporidiosis; buzağı, kuzu ve oğlakların kalabalık olarak barındırıldığı işletmelerde yaygın olup, özellikle bir aylığa kadar olan buzağılarda klinik tablo şekillenmektedir (77,135). *C. parvum*'a en yaygın olarak 1-3 haftalık genç hayvanlarda rastlanıldığı daha sonraki yaşlarda *Cryptosporidium* sp. oocystlerine rastlanma oranının yaşla ters orantılı olarak düştüğü bildirilmiştir (41,128). *C. ryanae* ve *C. bovis* ile enfeksiyonlar her nekadar 1-2 haftalık buzağılarda da rapor edilmesine karşın bu türlerin daha çok sütten kesilmiş buzağılar ile yılını doldurmuş sığırlarda daha yaygın bulunduğu belirtilmiştir (109,135). Bu çalışmada da yukarıdaki çalışmalara benzer olarak *C. parvum* 2 aylığa kadar olan buzağılarda enfeksiyondan sorumlu primer yaygın tür olarak tespit edilmiştir. Bunun yanında *C. parvum* prevalansının ≤15 gün yaş grubunda >15 gün yaş grubuna göre yüksek belirlenmesine karşın bu farklılık istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Benzer olarak buzağıların cinsiyet ve ırkına bağlı enfeksiyon oranlarında istatistiksel bir önem görülmemiştir ($p>0,05$). *C. parvum* pozitif belirlenen örneklerde parazitemiyi gösteren Ct (dR) değerlerinin sığırların yaş, cinsiyet ve ırk özelliklerine göre dağılımı incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Buna karşın Yıldırım ve ark. (35) Burdur yöresinde buzağılarda ≤2 ay yaş grubunda paraziteminin ≥6 ay yaş grubuna oranla daha yüksek olduğunu ve bu farklılığın istatistiksel açıdan da önemli olduğunu saptamışlardır. Araştırıcılar (35) bu sonucu 6 aylıktan büyük sığırların rezervuar görevi üstlendiğini göstermesine bağlamışlardır. Aynı araştırıcılar ayrıca Montofon ve

Holstein ırklarında parazitemiyi yerli ırka göre yüksek belirlemişler, bu farklılığı da istatistiksel açıdan önemli bulmuşlar ve bu sonucu yerli ırk sığırların *C. parvum* enfeksiyonlarına karşı diğer ırklara göre daha dirençli olduğunun bir göstergesi olabileceğini kaydetmişlerdir.

Sonuç olarak bu çalışma ile cryptosporidiosis'in prevalansı, Konya yöresinde ishalli buzağılarda moleküler olarak ortaya konmuştur. Enfeksiyondan sorumlu tür ve genotiplerin moleküler identifikasyonları yapılmıştır. Moleküler ve filogenetik analizler sonucu Konya yöresinde primer yaygınlık gösteren türün *C. parvum* olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada Real Time PCR tekniğinin, sahip olduğu yüksek sensitivite ve spesifitenin yanında, eş zamanlı hızlı teşhise ve kantitasyona olanak sağlaması ve paraziteminin belirlenebilmesi, dolayısıyla tedavi etkinliğinin takibi ve kontaminasyon riskinin minimize olması gibi avantajlarıyla sığır cryptosporidiosis'in teşhisinde yüksek etkinliğe sahip olduğu görülmüştür. Real Time PCR tekniğinin sahip olduğu bu avantajlarıyla özellikle moleküler epidemiyolojik çalışmalarda ve rezervuarların belirlenmesinde öne çıktığı dikkati çekmiştir. Ayrıca bu araştırma ile Konya yöresi sığırlarında zoonotik IIaA13G2R1 alt genotipinin *C. parvum* alt genotip familyalarından yaygınlık gösteren tek alt tip olduğu da ortaya konmuştur. Bu parazitin zoonotik karaktere sahip olması, halk sağlığı açısından özellikle yetiştiriciler, veteriner hekimler, epidemiyolojistler ve halk sağlığı uzmanlarının işbirliğinde risk faktörlerinin değerlendirilmesini ve etkin kontrol ve mücadele yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmektedir. Çalışma bu haliyle Türkiye'de sığır cryptosporidiosis'inin moleküler epidemiyolojisi ve hastalıktan sorumlu türler ve genotiplerin ortaya konması yönünde daha sonra yapılacak araştırmalara model olma niteliğindedir.

KAYNAKLAR

1. Özcel M.A., Özbel Y., Ak M., Tıbbi Parazit Hastalıkları. Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayın No:22 İzmir, (2007): s. 363-376.

2. Fayer R., Morgan U., Upton S.J., Epidemyology of cryptosporidium: transmission, detection and identification, *Int. J. Parasitol*., 30(12-13): 1305- 1322, (2000).

3. http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=660&tree=0.1 (Erişim Tarihi 17.09.2012).

4. Xiao L., Feng Y., Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. (2008), 52: 309-323.

5. Santi´N M., Trout J.M., Livestock. In: *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Eds. Fayer, R., Xiao, L., Boca Raton FL, CRC Press, (2007), pp. 451-483.

6. Fayer R., Santı´n M., Trout J.M., Cryptosporidium ryanaen sp (Apicomplexa:Cryptosporidiidae) in cattle (Bos taurus), Vet. Parasitol., 156: 191-198, (2008).

7. Widmer G., Suppression of Leishmania RNA Virus Replication by Capsid Protein Overexpression, *J. Virol.,* 69: 4122-4126, (1995).

8. Carraway M., Tzipori S., Widmer W., Identification of Genetic Heterogeneity in the *Cryptosporidium parvum* Ribosomal Repeat, *Appl. Environ. Microbiol*., 62: 712-716, (1996).

9. Peng M.M., Xiao L., Freeman A.R., Arrowood M.J., Escalante A.A., Weltman A.C., Ong C.S., Mac Kenzie W.R., Lal A.A., Beard C.B., Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles, Emerg. Infect. Dis., 3(4): 567-573, (1997).

10. Morgan U.M., Xiano L., Fayer R., Altaf A.L., Thompsonandrew R.C., Epidemiology and Strain Variation of *Cryptosporidium parvum, Cryptosporidiosis and Microsporidiosis*, 116-139, (2006).

11. Angus K.W., Cryptosporidiosis in Ruminants. In: *Cryptosporidiosis of man and animals*. Eds., Dubey, J.P., Speer, C.A., Fayer, R., CRC Press, Boca Raton, Florida, (1990), s.83-103.

12. Arslan M.Ö., Erdoğan H.M., Tanrıverdi S., Neonatal buzağılarda cryptosporidiosis'in epidemiyolojisi. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Program ve Özet Kitabı, SB6-01, Konya, s. 186, 08- 12 Eylül (2003).

13. Burgu A., Türkiye'de buzağılarda *Cryptosporidium*'ların bulunuşu ile ilgili ilk çalışmalar, *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg*., 31(3): 573-585, (1984).

14. Sarı B., Aktaş M.S., Arslan M.O., The prevalence of *Cryptosporidium* spp. in calves in Erzurum province, *Turkiye Parazitol. Derg*., 32(2): 116-119, (2008).

15. Özer E., Erdoğmuş S.Z., Köroğlu E., Elazığ yöresinde buzağı ve kuzularda bulunan *Cryptosporidium*'un yayılışı üzerinde araştırmalar. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 14: 439-445, (1990).

16. Özlem M.B., Eren H., Kaya O., Aydın yöresi buzağılarda *Cryptosporidium*'ların varlığının araştırılması, *Bornova Vet. Kont. Araş. Enst. Derg.*, 22: 15-22, (1997).

17. Sahal M., Karaer Z., Yasa Duru S., Cizmeci S., Tanyel B., Cryptosporidiosis in newborn calves in Ankara region: clinical, haematological findings and treatment with Lasalocid-NA, *Dtsch. Tierarztl Wochenschr*, 112(6): 203-208, (2005).

18. Emre Z., Alabay B.M., Fidancı H., Düzgün A., Çerçi H., Prevalence of *Cryptosporidium* spp. infection and its relation to other enteric pathogens (Escherichia coli K 99 and rotavirus) in cattle in Ankara, Turkey, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 22: 453-457, (1998).

19. Arslan M.Ö., Gıcık Y., Erdoğan H.M., Sarı B., Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in diarrhoeic calves in Kars province Turkey, *Turk. J. Vet. Anim. ScL*., 25: 161-164, (2001).

20. Mamak N., Özçelik S., Değerli S., Oğuztürk H., Akın Z., Zara (Sivas) yöresi sığırlarında *Cryptosporidium* infeksiyonunun prevalansı, *Turkiye Parazitol. Derg*., 24(4): 401-404, (2000).

21. Değerli S., Çeliksöz A., Kalkan K., Özçelik S., Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves in Sivas, *Turk. J. Vet. Anim. Sci*., 29: 995-999, (2005).

22. Göz Y., Gül A., Aydın A., Hakkari yöresinde sığırlarda *Cryptosporidium* sp.'nin yaygınlığı, *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg*., 18(2): 37-40, (2007).

23. Gül A., Çiçek M., Kılınç Ö., Prevalence of *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in calves in the Van province, *Turkiye Parazitol. Derg*., 32(3): 202-204, (2008).

24. Sevinç F., Irmak K., Sevinç M., The prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in the diarrhoiec and nondiarrhoeic calves, *Revue. Med. Vet*., 154(5): 357-361, (2003).

25. Derinbay E.Ö., Sevinç F., Coşkun A., Işık N., Sevinç M., İshalli buzağılarda cryptosporidiosisin yaygınlığı, *Eurasian J. Vet. Sci*., 27, 2: 123-126, (2011).

26. Sungur T., Kar S., Güven E., Aktaş M., Karaer Z., Vatansever Z., Detection of *Cryptosporidium* spp. in feces with nested PCR and carbol fuchsin staining method. *Turkiye Parazitol. Derg*., 32(4): 305-308, (2008).

27. Sakarya Y., Kar S., Tanyuksel M, Detection of *Cryptosporidium* spp. in humans and calves through Nested PCR and carbol fuchsin staining methods in Ankara, Turkey, *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg*., 16 (6): 977-980, (2010).

28. Tanriverdi S., Arslan M.Ö., Akiyoshi D.E., Tzipori S., Widmer G., Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves, *Mol. Biochem. Parasitol*., 130(1): 13-22, (2003).

29. Tanriverdi S., Markovics A., Arslan M.Ö., İtik A., Shkap V., Widmer G., Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations, *Appl. Enviro. Microbiol*., 72(4): 2507-2513, (2006).

30. Tamer G.S., Turk M., Dagci H., Pektas B., Guy E.C., Guruz A.Y., Uner A., The prevalence of cryptosporidiosis in Turkish children, and genotyping of isolates by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, *Saudi Med. J*., 28(8): 1243-1246, (2007).

31. Aysul N., Ulutaş B., Ünlü H., Hoşgör M., Atasoy A., Karagenç T., Aydın ilinde ishalli buzağılarda bulunan *Cryptosporidium* türlerinin moleküler Karakterizasyonu, 16. Ulusal Parazitol Kong, Program ve Özet Kitabı, S-15, s. 208, 1-7 Kasım, Adana, (2009).

32. Şimşek A.T., İnci A., Yıldırım A., Çiloğlu A., Bişkin Z., Düzlü Ö., Nevşehir Yöresindeki Yeni Doğan İshalli Buzağılarda Cryptosporidiosis'in Real Time PCR ve Nested PCR Yöntemleri ile Saptanması, *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg*., 9(2): 79-87, (2012).

33. Şimşek A.T., İnci A., Yıldırım A., Çiloğlu A., Bişkin Z., Düzlü Ö., Nevşehir yöresinde ishalli buzağılarda *Cryptosporidium* türlerinin moleküler prevalansı ve karakterizasyonu. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Program ve Özet Kitabı, Kars, (2011), s. 158-159.

34. Guven E., Avcioglu H., Balkaya I., Hayirli A., Kar S., Karaer Z., Prevalence of Cryptosporidiosis and Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Calves in Erzurum. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* Baskıda, (2013).

35. Yildirim A., Adanır R., İnci A., Yukarı BA., Düzlü Ö. Burdur Yöresindeki Sığırlarda Cryptosporidiosis'in Real Time PCR Yöntemi ile Araştırılması ve *Cryptosporidium* İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu. TUBİTAK 1002 Araştırma Projesi Sonuç Raporu, (2012).

36. Yildirim A., Ciloglu A., Inci A., Duzlu O., Biskin Z., The molecular prevalence and characterization of *Cryptosporidium* spp. in diarrhoeic calves from Central Anatolian Region of Turkey, 5th ACTMP, May15-17, Philippines, Manila, (2012).

37. Arslan M.Ö., İtik Ekinci A., Kars Yöresinde Sığırlarda *Cryptosporidium parvum* Subtiplerinin Belirlenmesi, *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 18* (Suppl-A): A221-A226, (2012).

38. Panciera R.J., Thomassen R.W., Garner F.M., Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol*., 8: 479, (1971).

39. Brenner J., Elad D., Markovics A., Grinberg A., Trainin Z., Epidemiological study of neonatal calf diarrhoea in Israel a one year survey of faecal samples, *Israel J. Vet. Med*., 48(3): 113-116, (1993).

40. Garcia A.M., Lima J.D., Frequency of *Cryptosporidium* in suckling dairy calves, *Arq. Brasil. Med. Vet. Zootec*., 45(2): 193- 198, (1993).

41. Maldonado-Camargo S., Atwill E.R., Saltijeral-Oaxaca J.A., Herrera-Alonso L.C., Prevalence of and risk factors forshedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairycalves in central Mexico, *Prev. Vet. Med*., 36: 95-107, (1998).

42. Uga S., Matsuo J., Kono E., Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocyst shedding in calves in Japan, *Vet. Parasitol*., 94(1-2): 27-32, (2000).

43. Lefay D., Naciri M., Poirier P., Chermette R., Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. *Vet. Parasitol*., 89: 1-9, (2000).

44. Castro-Hermida J.A., Gonzales-Losada Y.A., Ares-Mazas E., Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain), *Vet. Parasitol*., 106: 1-10, (2002).

45. Singh B.B., Sharma R., Kumar H., Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea inneonatal dairy calves, *Vet. Parasitol*., 140(1-2): 162-165, (2006).

46. Jiuttapalapong S., Pinyopanuwat N., Chimnoi W., Siripanth C., Stich R.W., Prevalence of *Cryptosporidium* among dairycows in Thailand. *Ann. N. Y. Acad. Sci*., 1081: 328-335, (2006).

47. Kvac M., Kouba M., Vitovec J., Age-related and housing dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairyand beef herds in South Bohemia, Czech Rebuplic. *Vet. Parasitol*., 137: 202-209, (2006).

48. Swai E.S., French N.P., Karimuribo E.D., Prevalence and determinants of *Cryptosporidium* spp. infection in smallholder dairy cattle in Iringa and Tanga regions of Tanzania, *Onderstepoort J. Vet. Res*., 74(1): 23-29, (2007).

49. Trotz-Williams L.A., Martin S.W., Leslie K.E., Duffield T., Nydam D.V., Association betweenmanagement practices and within-herd prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding on dairy farms in southern Ontario, *Prev. Vet. Med*., 83(1): 11-23, (2007).

50. Wade S.E., Mohammed H.O., Schaaf S.L., Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy herds in five countries of southeastern New York, *Vet. Parasitol*., 93: 1-11, (2000).

51. Starkey S.R., Kimber K.R., Wade S.E., Schaaf S.L., White M.E., Mohammed H.O., Risk factors associated with *Cryptosporidium* infection on dairy farms in a New York Statewatershed, *J. Dairy. Sci*., 89(11): 4229-4236, (2006).

52. Ayınmode A.B., Olakunle F.B., Xiao L., Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. innative calves in Nigeria, *Parasitol. Res*., 107: 1019-1021. (2010).

53. Tiranti K., Larriestra A., Vissio C., Picco N., Alustiza F., Degioanni A., Vivas A., Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and Giardia spp., spatial clustering and patterns of shedding in dairy calves from Córdoba, Argentina, *Rev. Bras. Parasitol. Vet*., 20(2): 140-147, (2011).

54. Hamnes I.S., Gjerde B., Robertson L., Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway, *Vet. Parasitol*., 140: 204-216, (2006).

55. Naciri M., Lelay M.P., Mancassola R., Poirier P.C., Berrnerte R., Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in necnatar diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France, *Vet. Parasitol*., 85: 245-257, (1999).

56. Chen X.M., Keithly J.S., Paya C.V., LaRusso N.F., Cryptosporidiosis, *N. Engl. J. Med*., 346, 22: 1723-1731, (2002).

57. Dubey J.P., Speer C.A., Fayer R., Cryptosporidiosis of man and animals. CRC Press, Boca Raton, USA, (1990),s. 199.

58. http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Frames/AF/Cryptosporidiosis/ body _Cryptospori diosis_life_cycle_lrg.htm (Erişim tarihi 17.09.2012)

59. Pohlenz J., Moon H.W., Cheville N.F., Bemrick W.J., Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 172: 452-457,(1978).

60. Sanford S.A., Josephson G.K.A, Bovine cryptosporidiosis: clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves, *Can. Vet. J.*, 23: 340-343, (1982).

61. Snodgrass D.R., Angus K.W., Gray E.W., Keir W.A., *Cryptosporidia* associated with roteavirus and *Escherichia coli* in an outbreak of calf seour, *Vet. Rec.*, 106: 458-459, (1980).

62. Sevinç F., Ruminantlarda cryptosporidiosis, *Vet. Bil. Derg*., 20(4): 79-84, (2004).

63. Starling C.R., Arrowood M.J., Cryptosporidia. In: *Parasitic Protozoa*, Academic Press, 65(6): 159-224, (1993).

64. Kar S., *Cryptosporidium Parvum'un* hücre kültüründe üretilmesi ve üremenin farklı yöntemlerle belirlenmesi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, (2007).

65. Sears C.L., Kirckpatrick B.D., Cryptosporidiosis and isosporiosis. In: *Principles and Practice of Clinical Parasitology*, John Wiley & Sons Ltd. Press, (2001), pp. 139-164.

66. Casemore D.P., Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis, *J. Clin. Pathol*., 44: 1321-1326, (1991).

68. Henriksen S.A., Pohlenz J.F.L., Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique, *Acta. Vet. Scand*., 22: 594-596, (1981).

69. Kaufmann J., Parasitic infections of domestic animals, A Diognostic Manual. Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, (1996), s. 423.

67. Murray P.R., Pfaller M.A., Medical Microbiology. 2. Ed., International student edition, (1994), s. 459.

70. Bişkin Z., Yıldırım A., İnci A., Düzlü Ö., Parazitolojide teşhis amaçlı kullanılan moleküler biyolojik teknikler, *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg*., 8(1): 43-51, (2011).

71. Morgan U.M., Thompson R.C.A., PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward? Parasitol. Today, 14: 469, (1998).

72. Wu Z., Nagano I., Boonmars T., Takahaski Y., Further evidence that genotype I and genotype II of *Cryptosporidium parvum* are distinct, *Trop. Med. Health*., 32(1): 5-14, (2004).

73. Jenkins M.C., Tout J., Abrahamsen M.S., Lancto C.A., Higgins J., Fayer R., Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts usin reverse transcriptase-polymerase chainreaction (RT-PCR) directed at mRNA encading amyloglucosidase, *J. Microbiol. Methods*., 43: 97-106, (2000).

74. Lindergard G., Nydam D.V., Wade S.E., Schaaf S.L., Mohammed H.O. The sensitivity of PCR detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples using two DNA extraction methods, *Mol. Diag*., 7(3-4): 147-153, (2003).

75. Jothikumar N., da Silva A.J., Moura I., Qvarnstrom Y., Hill V.R., Detection and differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by dual TaqMan assays. *J. Med. Microbiol*., 57(Pt 9):1099-1105, (2008).

76. Jex A.R., Smith H.V., Monis P.T., Campbell B.E., Gasser R.B., *Cryptosporidium*-biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation, *Biotechnol. Adv*., 26(4):304-317, (2008).

77. Xiao L., Molecular epidemiology of cryptospoidiosis: an update, *Exp. Parasitol*., 124: 80-89, (2010).

78. Calderaro A., Montecchini S., Gorrini C., Dettori G., Chezzi C., Similar diagnostic performances of antigen detection and nucleic acid detection of *Cryptosporidium* spp. in a low-prevalence setting, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*., 70(1):72-77, (2011).

79. Hadfield S.J, Robinson G., Elwin K., Chalmers R.M., Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR, *J. Clin. Microbiol*., 49(3):918-24, (2011).

80. Alves M., Matos O., Antunes F., Multilocus PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium* isolates from HIV-infected patients from Portugal, *Ann. Trop. Med Parasitol*, 95(6): 627-632, (2001).

81. Xiao L., Ryan U.M., Molecular epidemiology. In: *Cryptosporidium and cryptosporidiosis.* Eds., Fayer, R., Xiao, L., Second ed. CRC Press Boca Raton, (2008), pp. 119-172.

82. Xiao L., Morgan U.M., Limor J., Escalante A., Arrowood M., Shulaw W., Thompson R.C.A., Fayer R., Lal A.A., Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 3386-3391, (1999).

83. Feng Y., Ortega Y., He G., Das P., Xu M., Zhang X., Fayer R., Gatei W., Cama V., Xiao L., Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines, *Vet. Parasitol*., 144(1-2):1-9, (2007).

84. Chen X.M., Levine S., Splinter P.L., Tietz P.S., Ganong A.L., Jobin C., Gores G.J., Paya C.V., LaRusso N.F., *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor $_{k}\beta$ in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis, *Gastroenterology*, 120: 1774-1783, (2001).

85. Arrowood M.J., Jayens J.M., Healey M.C., In vitro activities of lytic peptides against sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. *Antimicrop. Agents Ch*., 35: 224-227, (1991).

86. Philpott D.J., Girardin S.E., Sansonetti P.J.,Innate immune responses of epithelial cells following infection with bacterial pathogens, *Curr. Opin. Immunol*., 13: 410-416, (2001).

87. Laurent F., Eckmann L., Savidge TC., Morgan C., Theodos C., Naciri M., Kagnoff M.F., *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infect. Immun*., 65: 5067-5073, (1997).

88. Wyatt C.R., McDonald V., Innate and T cell-mediated immune responses in cryptosporidiosis. In: *the Pathogenic Enteric Protozoa: Giardia, Entamoeba, Cryptosporidium and Cyclospora*. Eds., Sterling, C.R., Adam, R.D., New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers, (2004),s. 91-103.

89. Aktaş M., Dumanlı N., Altay K., Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. In: *Eimeria ve Cryptosporidium enfeksiyonlarında immunite*. Eds., Özcel, M.A., İnci, A., Turgay, N., Köroğlu, E., Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, (2007), s. 485-490.

90. Mcdonald V., Bancroft G.J., Immunological control of *Cryptosporidium* infection, *Chem. Immunol*., 70: 103-123, (1998).

91. Lefay D., Naciri M., Polrier P., Chermene R., Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves, *Vet. Rec*., 148(4): 108-112, (2001).

92. Lindsay D.S., Blagburn B.L., Antiprotozoan Drugs. Adams HR. Ed. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Eight Edition, Iowa State University Press, Ames, (2001) s. 992-1016.

93. Kocaoğlu Güçlü B., Kara K., Ruminant beslemede alternatif yem katkı maddelerinin kullanımı: 1. probiyotik, prebiyotik ve enzim. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg*., 6(1): 65-75, (2009).

94. De Graaf D.C., Vanopdenbosch E., Ortega-Mora L.M., Abbassi H., Peeters J.E., A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals, *Int. J. Parasitol*., 29: 1269-1287, (1999).

95. Pakkanen R., Aalto J., Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum, *Int. Dairy Journal*, 7: 285-297, (1997).

96. Unat E.K., Tıbbi parazitoloji. In: *Unat'ın Tıp Parazitolojisi*. Eds. Unat, E.K., Yücel, A., Atlaş, K., Samastı, M., 5. baskı, Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayınları, No:15, İstanbul, (1995), s. 481- 680.

97. Teipari S., *Cryptosporidium*, notes on epidemiology and pathogenesis, *Parasitology Today*, 33: 24-29, (1985).

98. İnci A., İça A., Yıldırım A., Vatansever Z., Çakmak A., Albasan H., Çam Y., Atasever A., Sarıözkan S., Düzlü Ö., Economical impact of tropical theileriosis in the Cappadocia region of Turkey. *Parasitol. Res*., Suppl 2: s171-174, (2007).

99. Casemore DP, Armstrong M, Sands RL., Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J Clin Pathol.,* 38(12):1337-1341, (1985).

100. Widmer G., Akiyoshi D., Buckholt M.A., Feng X., Rich S.M., Deary K.M., Bowman C.A., Xu P., Wang Y., Wang X., Buck G.A., Tzipori S., Animal propagation and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum, Mol. Biochem. Parasitol*., 108, 187-197, (2000).

101. Ryan U., Xiao L., Read C., Zhou L., Lal A.A., Pavlasek I., Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic, *Appl. Environ. Microbiol.,* 69(7): 4302-4307, (2003).

102. Hall T.A., Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95-98, (1999).

103. Drummond A.J., Ashton B., Buxton S., Geneious v5.5, Available from http://www.geneious.com.

104. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Mol. Biol Evol.,* 28(10): 2731-2739, (2011).

105. Peng M.M., Matos O., Gatei W., Das P., Stantic-Pavlinic M., Bern C., Sulaiman I.M., Glaberman S., Lal A.A., Xiao L., A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *J. Eukaryot. Microbiol*.;Suppl: 28-31, (2001).

106. Glaberman S., Moore J.E., Lowery C.J., Chalmers R.M., Sulaiman I., Elwin K., Rooney P.J., Millar B.C., Dooley J.S., Lal A.A., Xiao L., Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland, *Emerg. Infect. Dis*., 8(6): 631-633, (2002).

107. Albayrak A.S., Eroğlu A., Kalaycı Ş., Küçüksille E., Ak B., Karaatlı M., Güvenirlik Analizi. Kalaycı Ş (ed), SPSS Uygulamalı Çok Değişkenli İstatistik Teknikleri. Asil yayın dağıtım, Ankara, (2005).

108. Fayer R., Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*, *Exp. Parasitol*., 124(1): 90-97, (2010).

109. Santi'n M., Trout J.M., Fayer R., A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age, *Vet. Parasitol*., 155(1-2): 15-23, (2008).

110. Khan S.M., Debnath C., Pramanik A.K., Xiao L., Nozaki T., Ganguly S., Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India, *Vet. Parasitol*., 171(1-2): 41-47, (2010).

111. Fayer R., *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite, *Vet. Parasitol*., 126: 37-56, (2004).

112. Ramirez N.E., Ward L.A., Sreevatsan S., Review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals, *Microbes and Infection*, 6: 773-785, (2004).

113. Thompson R.C.A., Olson M.E., Zhu G., Enomoto S., Abrahamsen M.S., Hijjawi N.S., *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, *Adv. Parasitol*., 59: 77-158, (2005).

114. Olson M.E., O'Handley R.M., Ralston B.J., McAllister T.A.,Thompson R.C., Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle, *Trends Parasitol*., 20: 185-191, (2004).

115. Santi´N M., Trout J.M., Xiao L., Zhou L., Greiner E., Fayer R., Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves, *Vet. Parasitol*., 122: 103-117, (2004).

116. Slapeta J., *Cryptosporidium* species found in cattle: a proposalfor a new species, *Trends Parasitol*., 22: 469-474, (2006).

117. Slifko T.R., Smith H.V., Rose J.B., Emerging parasite zoonoses associated with water and food, *Int. J. Parasitol*., 30: 1379-1393, (2000).

118. Caccio S.M., Pozio E., Advances in the epidemiology, diagnosisand treatment of cryptosporidiosis, *Expert. Rev. Anti. Infect.Ther*., 4: 429-443, (2006).

119. Karanis P., Kourenti C., Smith H., Waterborne transmissionof protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks andlessons learnt, *J. Water Health*, 5: 1-38, (2007).

120. Yılmaz K., Özer E., Erkal N., Parazitsiz ve parazitli buzağılarda demir yetersizliği anemisi yönünden araştırmalar, *F.Ü. Sağlık Bil. Derg.*, 7 (2): 102-111, (1992).

121. Çitil M., Arslan M.Ö., Güneş V., Erdoğan H.M., Neonatal buzağı ishallerinde *Cryptosporidium* ve *Eimeria* enfeksiyonlarının rolü, *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg*., 10 (1): 59-64, (2004).

122. Çeliksöz A., Çelik S., Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi'nde gastroenteritli ve malnütrisyonlu hastalarda *Cryptosporidium* spp. Araştırması, *Turkiye Parazitol. Derg*., 27: 85-88, (2003).

123. Aştı C., Özbakış G., Azrug A.F., Orkun Ö., Nalbantoğlu S., Çakmak A., Burgu A., Farklı İllere Ait Buzağı Dışkı Bakısı Sonuçları, 18 (Suppl-A): A209-A214, (2012).

124. Çiçek M., Körkoca H., Gül A., Van belediyesi mezbahasında çalışan işçilerde ve kesimi yapılan hayvanlarda *Cryptosporidium* sp.'nin araştırılması, *Turkiye Parazitol. Derg*., 32 (1): 8-11, (2008).

125. Dirim Erdoğan D., Dağci H., Turgay N., Akarca U.S., Alkan M.Z., The molecular diagnosis of cryptosporidiosis in fresh and formalin preserved fecal samples, *Turkiye Parazitol. Derg*., 33(2): 120-124, (2009).

126. Arrowood M.J, Diagnosis. In: *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Ed. Fayer, R., US: CRC Press, (1997), p. 43-64

127. De Waele V., Berzano M., Speybroeck N., Berkvens D., Mulcahy G.M., Murphy T.M., Peri-parturient rise of *Cryptosporidium* oocysts in cows: New insights provided by duplex quantitative real-time PCR, *Vet. Parasitol*., 189(2-4): 366-368, (2012).

128. De Waele V., Berzano M., Berkvens D., Speybroeck N., Lowery C., Mulcahy G.M., Murphy T.M., Age-stratified Bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves, *J. Clin. Microbiol*., 49(1): 76-84, (2011).

129. Sulaiman I.M., Hira P.R., Zhou L., Al-Ali F.M., Al-Shelahi F.A., Shweiki H.M., Iqbal J., Khalid N., Xiao L., Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait, *J. Clin. Microbiol*., 43: 2805-2809, (2005).

130. Leoni F., Mallon M.E., Smith H.V., Tait A., McLauchlin J., Multilocus analysisof *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* from sporadic andoutbreak-related human cases and *C. parvum* from sporadic cases in livestock inthe UK, *J. Clin. Microbiol.*, 45: 3286-3294, (2007).

131. Wielinga P.R., de Vries A., van der Goot, T.H., Mank T., Mars M.H., Kortbeek L.M.,van der Giessen J.W., Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands, *Int. J. Parasitol*., 38: 809-817, (2008).

132. O'Connor R.M., Wanyiri J.W., Cevallos A.M., Priest J.W., Ward H.D., *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surfaceby association with gp15. *Mol. Bio. Parasitol*., 156: 80-83, (2007).

133. Quilez J., Torres E., Chalmers R.M., Hadfield S.J., Del Cacho E., Sanchez-Acedo C., Genotype and subtype characterization of *Cryptosporidium* in lambs andgoat kids in Spain, *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 6026-6031, (2008).

134. Quilez J., Torres E., Chalmers R.M., Robinson G., Del Cacho E., Sanchez-Acedo C., *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain, *Parasitology*, 135: 1613-1620, (2008).

135. Wang R., Wang H., Sun Y., Zhang L., Jian F., Qi M., Ning C., Xiao L., Characteristics of *Cryptosporidium* transmission in preweaned dairy cattle in Henan, China, *J. Clin. Microbiol*., 49(3): 1077-1082, (2011).